



Transport du pyruvate et régulations du métabolisme central par le malate chez *Bacillus subtilis*

Teddy Charbonnier

► To cite this version:

Teddy Charbonnier. Transport du pyruvate et régulations du métabolisme central par le malate chez *Bacillus subtilis*. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS076 . tel-01318095

HAL Id: tel-01318095

<https://theses.hal.science/tel-01318095>

Submitted on 24 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS076

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
"L'UNIVERSITE PARIS-SUD"

ECOLE DOCTORALE N°577
Structure et dynamique des systèmes vivants

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

M. Teddy Charbonnier

**Transport du pyruvate et régulations du métabolisme central
par le malate chez *Bacillus subtilis***

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 22 mars 2016 :

Composition du Jury :

Mme Martin-Verstrate Isabelle	Professeure, Institut Pasteur	Président
M. Condon Ciarán	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
M. Létisse Fabien	Maître de Conférences, Université Toulouse 3	Rapporteur
M. Boulloc Philippe	Directeur de Recherche, Université Paris-Sud, CNRS	Examineur
M. Doan Thierry	Chargé de Recherche, CNRS	Examineur
M. Jules Matthieu	Chargé de Recherche, INRA	Co-encadrant de thèse
M. Aymerich Stéphane	Directeur de Recherche, INRA	Directeur de thèse

NNT : 2016SACLS076

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
"L'UNIVERSITE PARIS-SUD"

ECOLE DOCTORALE N°577
Structure et dynamique des systèmes vivants

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

M. Teddy Charbonnier

**Transport du pyruvate et régulations du métabolisme central
par le malate chez *Bacillus subtilis***

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 22 mars 2016 :

Composition du Jury :

Mme Martin-Verstrate Isabelle	Professeure, Institut Pasteur	Président
M. Condon Ciarán	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
M. Létisse Fabien	Maître de Conférences, Université Toulouse 3	Rapporteur
M. Boulloc Philippe	Directeur de Recherche, Université Paris-Sud, CNRS	Examineur
M. Doan Thierry	Chargé de Recherche, CNRS	Examineur
M. Jules Matthieu	Chargé de Recherche, INRA	Co-encadrant de thèse
M. Aymerich Stéphane	Directeur de Recherche, INRA	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse doit énormément aux nombreuses personnes qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de ces années. Je tiens ici à leur exprimer ma gratitude.

Je suis très honoré et je remercie Mme Isabelle MARTIN-VERSTRATE d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury de thèse. Je remercie également Mr Ciaran CONDON et Mr Fabien LETISSE qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse ainsi que, Mr Thierry DOAN et Mr Philippe BOULOC d'en être les examinateurs.

Je tiens à remercier chaleureusement Stéphane AYMERICH, de m'avoir accepté au sein de son équipe et de m'avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant qui m'a fait découvrir de nombreuses techniques qui me seront d'une grande aide pour la suite.

Je remercie très chaleureusement Matthieu JULES pour m'avoir encadré tout au long de ma thèse, pour sa disponibilité, pour son soutien, pour son expertise et pour avoir réussi à me redonner confiance dans mes moments de doute. Mes presque 4 années (avec mon master) à son contact m'ont énormément apporté et m'ont permis d'évoluer professionnellement et personnellement.

Je remercie Dominique LE COQ pour son expertise et pour ses remarques pertinentes qui m'ont permis de progresser.

Merci à toute l'équipe ex-RG2B pour son soutien, merci à Vincent pour ta bonne humeur et les discussions pointues sur la tactique du PSG, à Aurélie pour ta gentillesse et pour m'avoir laissé honteusement tricher aux mots croisés, à Magali pour les discussions, ton aide et pour avoir supporté mes blagues parfois douteuses, à Claire qui m'a permis de ne pas toujours être seul à manipuler, à Michèle qui venait voir si tout allait bien et si j'étais toujours vivant et à Olivier Borkowski de m'avoir permis de m'intégrer au sein de l'équipe et du CBAI.

Merci à l'équipe ex-IFPC de m'avoir accueilli, à Olivier Delumeau pour m'avoir aidé avec mes protéines, et à Anne-Gaëlle et Etienne pour les bons moments passés en Italie (ceci n'inclut pas l'épisode des clés).

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai passé de bons moments à Grignon. Merci à Guy, Denise pour leur aide précieuse. Merci Anne qui a su trouver les mots lorsque j'en ai eu besoin. Merci à Mathieu (avec un T), même si je ne sais pas si je dois vraiment le remercier et

à Nicolas (parce qu'avoir un supporter de Clermont c'est toujours l'occasion de bien rire, surtout aux alentours des finales)

Merci à Guillaume et Céline pour les soirées jeux/pizzas bien marrantes (même si nous ne sommes pas l'équipe la plus efficace pour la défense d'un vaisseau), à tous mes colocataires présents et passés pour les soirées passées ensemble, à tous mes amis que je ne vois pas assez, Anne-Laure, Yannick, Fanny, Florent, Charlotte, Bertrand, Wilfried, tous mes amis de la Paille et toutes les personnes que j'oublie de citer.

Enfin, je remercie mes parents pour leurs encouragements inconditionnels, mon frère et ma belle-sœur pour s'occuper de moi à chacun de mes passages à Tours.

Résumé

Chez *Bacillus subtilis* comme pour toutes les bactéries, le métabolisme central du carbone est essentiel pour la croissance de la cellule. Elle utilise le glucose (source de carbone glycolytique) et le malate (source de carbone gluconéogénique) comme sources de carbone préférentielles. Ces deux sources de carbone sont capables d'induire la répression catabolique au travers de la protéine régulatrice CcpA et ainsi d'établir une hiérarchie dans l'utilisation des sources alternatives de carbone. Au centre du métabolisme du carbone se trouve le pyruvate que *B. subtilis* est capable d'utiliser comme seule source de carbone, mais son transporteur reste inconnu.

Des analyses transcriptomiques ont montré que seul l'opéron *ysbAB* était spécifiquement induit en présence de pyruvate, et nous avons montré que sa délétion entraînait une perte de croissance presque totale sur pyruvate. En utilisant des protéines étiquetées, nous avons mis en évidence qu'YsbA et YsbB formaient un complexe se localisant à la membrane. Nous avons ensuite montré que ce complexe est le transporteur principal du pyruvate et fonctionne comme un transporteur par diffusion facilitée. À l'aide d'une fusion rapportrice, nous avons démontré que l'opéron *lytST* situé en amont d'*ysbAB*, et codant pour un système à deux composants, était responsable de l'induction d'*ysbAB*. Nous avons également montré qu'en plus d'une répression par CcpA en présence de glucose ou de malate, une régulation dépendante de l'activité enzyme malique de MaeA s'exerce sur *ysbAB*. Cette régulation est due à l'accumulation de pyruvate dans la cellule qui perturbe l'activation d'*ysbAB* par LytST.

Nous avons aussi montré qu'une régulation indépendante de CcpA s'exerce sur *dctP*, le gène codant pour le transporteur du succinate et du fumarate en présence de malate, suggérant un mécanisme similaire à celui observé pour *ysbAB*. Enfin, nous avons montré que le flux métabolique traversant MaeA était également impliqué dans la régulation par CcpA de l'entrée des sources glycolytiques par le malate.

Mots clés : *Bacillus subtilis*, pyruvate, transport, régulation, malate

Abstract

In *Bacillus subtilis* like for all the bacteria, the central carbon metabolism is essential for growth. It uses glucose (a glycolytic carbon source) and malate (a gluconeogenic carbon source) as preferential carbon sources. These two carbon sources are able to induce carbon catabolite repression through the transcription factor CcpA and thus establishing a hierarchy in the use of alternative carbon sources. The pyruvate is in the middle of the carbon metabolism, and can be used by *B. subtilis* as sole carbon source; however its transporter remains unknown.

Transcriptome analyses revealed that the only operon specifically expressed in cells grown on pyruvate is *ysbAB*, and we showed that its deletion led to a strong growth defect on pyruvate. Using tagged proteins, we highlighted that YsbA and YsbB formed a complex localized at the membrane. We next showed that this complex is the major pyruvate transporter, and operates as a facilitated transporter. Using a reporter fusion, we showed that the operon *lytST* located upstream of *ysbAB*, and coding for a two-component system, is responsible for the induction of *ysbAB*. We also showed that besides the CcpA-mediated repression by both glucose and malate, an additional regulation mechanism through the malic enzyme activity of MaeA is acting on *ysbAB*. This regulation is due to the accumulation of pyruvate in the cell which hinders the LytST-mediated induction of *ysbAB*.

We also showed that a CcpA-independent repression is exerted on *dctP*, the gene coding for the succinate and fumarate transporter, in the presence of malate, suggesting a regulation mechanism similar to the one observed for *ysbAB*. Finally, we showed that the metabolic flux going through MaeA is also involved in the CcpA-dependent repression of the genes coding for glycolytic transporter in presence of malate.

Key words : *Bacillus subtilis*, pyruvate, transport, regulation, malate

Table des matières

Avant-propos	17
Introduction.....	21
I Transport des sources de carbone	21
I.1 Les familles de transporteurs.....	21
I.1.1 Le transport par diffusion facilitée.....	22
I.1.2 Transport actif secondaire	22
I.1.3 Le transport actif primaire ATP-dépendant	24
I.1.4 Transport PEP-dépendant	25
I.2 Les systèmes d'import des sources carbonées majeures chez les bactéries.....	25
I.2.1 Le système de transport PTS.....	25
I.2.2 Les systèmes de transport non PTS	27
I.3 Le transport du pyruvate	29
I.3.1 Chez les eucaryotes.....	29
I.3.2 Chez les procaryotes.	30
II Métabolisme du carbone chez les bactéries.....	33
II.1 La glycolyse	33
II.1.1 Description générale	33
II.1.2 Bilan de la glycolyse.....	35
II.1.3 Les enzymes spécifiques de la glycolyse ou de la gluconéogenèse.....	37
II.2 La voie des pentoses phosphates	40
II.2.1 Description générale	40
II.3 Le cycle de Krebs	41
II.3.1 Description générale	41
II.4 La voie de l'overflow	43
II.5 Le pyruvate : un métabolite central	44

II.5.1	Le nœud du pyruvate	45
II.5.2	Rôle du pyruvate dans la régulation du métabolisme	48
II.5.3	Rôle du pyruvate dans le devenir de la cellule.....	48
II.5.4	Rôle du pyruvate dans la virulence	50
II.5.5	Rôle du pyruvate dans certaines maladies chez l'Homme	50
III	Régulation des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du carbone chez <i>Bacillus subtilis</i>	53
III.1	Activation de l'expression des transporteurs par les systèmes à deux composants 54	
III.1.1	Description générale	54
III.1.2	Partenaires des systèmes à deux composants.....	57
III.2	La répression catabolique dépendante de CcpA.....	58
III.2.1	La répression catabolique par le glucose	61
III.2.2	La répression catabolique par le malate.....	62
III.2.3	Activation catabolique par CcpA : « l'overflow ».....	63
III.3	Répression catabolique autre que CcpA.....	63
III.3.1	Régulation par CodY, CcpB et CcpC	63
III.3.2	Régulation des voies glycolytique et gluconéogénique par CggR et CcpN	66
Résultats.....		71
IV	Problématiques.....	71
V	Article	73
V.1	Abstract	74
V.2	Introduction	75
V.3	Results	77
V.3.1	The <i>B. subtilis</i> <i>ysbAB</i> (<i>pftAB</i>) operon encodes a membrane protein complex essential for growth on pyruvate	77
V.3.2	The YsbAB (PftAB) membrane complex operates as a facilitated transporter of pyruvate	80

V.3.3	The LytST TCS induces <i>pftAB</i> expression in the presence of pyruvate.	83
V.3.4	Malate represses transcription of <i>pftAB</i> by a malic enzyme-dependent but CcpA-independent mechanism.	85
V.3.5	Intracellular pyruvate hinders the extracellular pyruvate-dependent induction of <i>pftAB</i> by LytST.	87
VI	Régulation de l'entrée des sources de carbone gluconéogéniques	91
VI.1	Rôle de <i>ccpA</i> et <i>lytST</i> lors de la croissance en milieu minimum.	91
VI.2	Régulation de l'entrée des sources de carbone gluconéogéniques par le malate.	91
VI.2.1	Régulations de <i>dctP</i> , dépendante et indépendante de CcpA.	92
VI.2.2	La régulation de <i>maeN</i> en présence de malate.	93
VII	Régulation de l'entrée des sources de carbone glycolytiques par le malate.	95
VII.1	Introduction	95
VII.2	Résultats.	95
VII.2.1	Rôle du système à deux composants malK/R.	95
VII.2.2	Rôle des enzymes maliques.	96
VII.2.3	Le flux métabolique est impliqué dans la régulation par CcpA	98
	Discussion et perspectives	101
VIII	L'opéron <i>pftAB</i> code pour un transporteur passif du pyruvate.	101
IX	Régulation de <i>pftAB</i> par le pyruvate	105
X	Régulation de <i>pftAB</i> par le malate et homéostasie du pyruvate.	107
XI	Un mécanisme similaire pour d'autres sources de carbone ?	109
XII	Régulation des sources de carbone glycolytiques par le malate	110
	Matériels et méthodes	115
XIII	Matériels et méthodes	115
XIII.1	Milieus et conditions de croissance.	115
XIII.2	Souches bactériennes.	116
XIII.3	Manipulation de l'ADN.	117

XIII.4	Clonages et constructions de plasmides.	117
XIII.5	Mutagenèse aléatoire par transposition.	120
XIII.6	Expérience en Live Cell Array.	121
XIII.7	Expérience en TAP-Tag.	122
XIII.8	Mesure des concentrations des métabolites extracellulaires.	123
	Bibliographie	131
	Annexe	147

Figures

Figure 1 : Phénomène de diauxie.	18
Figure 2 : Les quatre types de transporteur décrits chez les bactéries.....	22
Figure 3 : Les mécanismes de transport secondaire décrits chez les bactéries.....	23
Figure 4 : Schéma de l'organisation générale du PTS chez <i>Bacillus subtilis</i>	26
Figure 5 : Représentation schématique du métabolisme central du carbone chez <i>Bacillus subtilis</i>	34
Figure 6 : La glycolyse chez <i>Bacillus subtilis</i>	36
Figure 7 : Voie des pentoses phosphates chez <i>Bacillus subtilis</i>	41
Figure 8 : Cycle de Krebs et les voies s'y rattachant chez <i>Bacillus subtilis</i>	42
Figure 9 : Voie de "l'overflow" chez <i>Bacillus subtilis</i>	44
Figure 10 : Répartition de PDH E1 α et disposition des anneaux Z en fonction de la concentration en pyruvate de la cellule.	49
Figure 11 : Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (effet Warburg).....	52
Figure 12 : Représentation de la forme canonique d'un système à deux composants.	55
Figure 13 : Schéma d'une histidine kinase et d'un "phosphorelay".....	56
Figure 14 : Schéma des différentes possibilités de régulation croisée des systèmes à deux composants.....	57
Figure 15 : Répartition des domaines régulateurs des protéines régulatrices des systèmes à deux composants.....	58
Figure 16 : Schéma de la répression catabolique lié au PTS chez <i>Bacillus subtilis</i> . .	60
Figure 17 : Représentation schématique de la régulation des gènes des premières étapes du cycle de Krebs.....	66
Figure 18 : Régulation de l'opéron gapA par CggR.....	67
Figure 19 : Représentation schématique de la régulation par CcpN.....	68
Figure 20. Expression, role and localization of <i>ysbAB</i> (<i>pftAB</i>) during growth of <i>B. subtilis</i> cells on pyruvate.	78
Figure 21. The YsbA/YsbB protein complex.....	80
Figure 22. Functional characterization of the YsbAB (PftAB) pyruvate transporter.	81

Figure 23. Growth of various strains and corresponding extracellular metabolite concentrations.....	83
Figure 24. The LytST TCS binding site.....	85
Figure 25. Transposon mutagenesis identified genes involved in the malate-induced CcpA-independent catabolite repression of <i>ysbAB</i>	87
Figure 26. Pyruvate influx tightly controls <i>pftAB</i> expression.....	89
Figure 27. Zones d'insertions des plasmides rapporteurs dans l'opéron <i>dctSRP</i>	92
Figure 28. . Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur interne de <i>dctP</i> ou de l'opéron <i>dctSRP</i>	93
Figure 29. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur de <i>maeN</i>	94
Figure 30. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bgIPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans un mutant du système à deux composants MalK/R.....	96
Figure 31. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bgIPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans des contextes génétiques mutés pour les gènes <i>mleA</i> , <i>malS</i> et <i>ytsJ</i>	97
Figure 32. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bgIPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans des contextes génétiques mutés pour l'opéron <i>maeA</i>	98
Figure 33. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bgIPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans des conditions de surexpression du gène codant l'enzyme malique MaeA.	99
Figure 34. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bgIPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans des conditions de surexpression des gènes codant les enzymes maliques MalS, MleA et YtsJ en absence de <i>MaeA</i>	100
Figure 35. Schéma du système de régulation Cid/Lrg chez <i>S. aureus</i>	103
Figure 36. Schéma de la régulation du métabolisme du carbone chez <i>B. subtilis</i> ..	104
Figure 37. Carte du plasmide pBSBysbAB.....	118
Figure 38. Méthode du LIC (Ligation-Independent Cloning).....	119
Figure 39. Carte du plasmide pDR111ysbAB.....	120
Figure 40. Carte du plasmide pIC333.....	121
Figure 41. Méthodologie du LCA (Live Cell Array).	122
Figure 42. Exemple de chromatogramme obtenu pour les acides.....	124

Tableau 1 Growth rates measured in minimal media with various carbon sources from 96-well microtiterplates	79
Tableau 2. Induction of <i>pftAB</i> by the LytST TCS.	84
Tableau 3. CcpA-dependent and independent catabolite repressions of <i>pftAB</i>.....	86
Tableau 4. Liste des souches de <i>B. subtilis</i> (<i>Bs</i>) et de <i>C.glutamicum</i> (<i>Cg</i>) utilisées au cours de ce travail.....	125
Tableau 5. Liste des amorces utilisées au cours de ce travail	129

Avant-propos

Les bactéries sont des organismes présents sur Terre dans presque tous les milieux et environnements. Les conditions de croissances qu'elles y rencontrent peuvent être extrêmement variables. Ainsi, les nutriments disponibles varient en quantité et en qualité d'un milieu à l'autre, ou, au cours du temps, au sein même d'un milieu. Pour croître et se développer, les bactéries utilisent ces nutriments pour fabriquer les molécules de base nécessaires à leur auto-réplication, telles que les lipides, les glucides et les acides aminés. L'anabolisme est l'ensemble des réactions chimiques permettant la production de ces molécules. Cette production nécessite de l'énergie issue principalement de la dégradation de molécules organiques : c'est le catabolisme. Ces deux grands ensembles de réactions chimiques constituent le métabolisme. Parmi les nutriments disponibles dans le milieu, les ressources en carbone ont une importance cruciale. En effet, les structures vivantes sont toutes basées sur le carbone. Son métabolisme est donc primordial pour la constitution des molécules nécessaires à la croissance de la cellule. De plus, les composés carbonés sont d'excellents réservoirs d'énergie et leur catabolisme représente la principale source d'énergie pour la cellule. La capacité d'une bactérie à utiliser de façon optimale les sources de carbone disponibles est donc capitale pour son adaptation et sa survie. Un moyen efficace pour favoriser l'utilisation des sources de carbone les plus appropriées pour la croissance consiste en la stricte régulation de l'expression des gènes impliqués dans leur transport et leur métabolisme. Cette régulation a été étudiée la première fois chez les bactéries par Jacques Monod (Monod, 1942). Il a observé que lors d'une croissance dans un milieu contenant deux sources de carbone, il était possible de distinguer deux phases de croissance séparées par une phase de latence (**Figure 1**). Il a nommé ce phénomène la diauxie, et a par la suite montré que les deux sources de carbone n'étaient pas utilisées concomitamment mais de façon séquentielle et hiérarchique. Dans les années qui ont suivi, il a été montré que les sources préférentielles de carbone telles que le glucose, le fructose ou le saccharose, étaient capables de réprimer la synthèse des enzymes impliquées dans le transport et le métabolisme des sources de carbone secondaires. Cette régulation, appelée la répression catabolique (CCR pour Carbon Catabolite Repression) (Contesse *et al*, 1970), est liée au système de transport phosphoénolpyruvate:carbohydrate phosphotransférase système (PTS), qui catalyse l'entrée et la phosphorylation de plusieurs sucres (ou carbohydrates) chez de nombreuses bactéries.

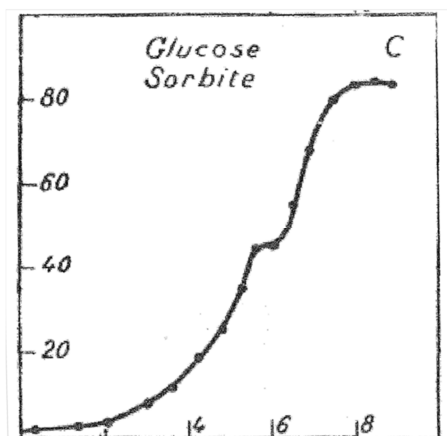


Figure 1 : Phénomène de diauxie. Croissance avec du glucose et du sorbitol comme sources de carbone chez *B. subtilis*. D'après Monod, 1942

Bacillus subtilis est largement acceptée comme modèle des bactéries à Gram positif (Sonenshein *et al*, 2002). Elle appartient au Phylum des *Firmicutes* qui contient trois classes principales que sont les *Clostridia*, les *Bacilli* (comprenant notamment *Bacillus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*) et les *Erysipelotrichales*. Avec *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, pour les bactéries à Gram négatif, elle est l'une des bactéries les plus étudiées. Très rapidement ont été mises en évidence ses capacités à devenir génétiquement compétente et à sporuler en réponse à des stress environnementaux. La découverte de ces deux propriétés importantes en ont fait un organisme particulièrement attractif : sa compétence naturelle a rendu possible très tôt son étude génétique, tandis que sa capacité à sporuler a été utilisée comme modèle simple pour comprendre les mécanismes de différenciation cellulaire. Par ailleurs, *B. subtilis* et d'autres Bacillacées proches présentent un intérêt économique certain pour les industries pharmaceutiques, chimiques et agroalimentaires par leur aptitude à sécréter des enzymes en grande quantité (Schallmey *et al*, 2004). Elles restent encore très largement utilisées en tant qu'usines bactériennes et permettent notamment la production de protéases incorporées dans les lessives, d'amylases impliquées dans la dégradation de l'amidon afin d'obtenir des sucres simples ainsi que dans la production de vitamines (*e.g.* riboflavine), d'insecticides (*e.g.* endotoxines) et d'antibiotiques (*e.g.* bacitracine, butirosine). La production à grande échelle de ces éléments entraîne pour les industries des coûts importants, dont la réduction reste une priorité. Une manière efficace de contrôler les coûts de production est de mieux maîtriser la distribution des ressources au sein de la bactérie, ce qui passe par une meilleure connaissance et maîtrise des différents métabolismes.

C'est ainsi qu'un consortium européen et japonais s'est mis en place afin de séquencer le génome de *B. subtilis*. Dès 1997, un premier séquençage complet de la souche de laboratoire 168 est réalisé (Kunst *et al*, 1997). Il révèle un génome de plus de 4 millions de paires de bases contenant approximativement 4200 gènes. La comparaison entre les génomes de *B. subtilis* et d'*E. coli*, la bactérie modèle des bactéries à Gram négatif, qui ont divergé il y a près d'un milliard d'années, montre que près d'un quart du génome de *B. subtilis* possède des orthologues clairs chez *E. coli*. Cela indique qu'un nombre important de fonctions cellulaires sont conservées malgré leur éloignement. Un nouveau séquençage plus récent (Barbe *et al*, 2009) a permis d'améliorer la qualité de la séquence et de corriger les erreurs dues aux difficultés techniques des premières méthodes de séquençage. L'avènement des technologies à haut débit couplé à la connaissance du génome de *B. subtilis* a permis le lancement du projet européen BaSysBio (Bacillus Systems Biology) (2006-2010) regroupant plus de quinze organismes de recherche dans le but de développer les techniques de biologie des systèmes permettant l'étude globale de la régulation des gènes de *B. subtilis*. Ainsi l'intégralité de son transcriptome a été étudié dans cent quatre conditions différentes allant de la croissance sur différentes sources de nutriments à la sporulation en passant par l'application d'une large variété de stress (Nicolas *et al*, 2012). Cette étude a montré que seules environ 3% des séquences codantes sont exprimées dans toutes les conditions, indiquant que la majorité des gènes de *B. subtilis* sont spécifiquement exprimés dans des conditions particulières. Ce projet a également permis d'étudier de façon dynamique l'adaptation du métabolisme à un changement de milieu. La transition d'une croissance en glucose à une croissance en glucose plus malate, et symétriquement d'une croissance en malate à une croissance en malate plus glucose ont donc été étudiées et ont mis en évidence une adaptation différentielle entre ces deux transitions de croissance (Buescher *et al*, 2012). Le projet européen BaSynthec (Bacterial Synthetic minimal genomes for biotechnology) (2010-2013), regroupant huit partenaires académiques et industriels, a également été mis en place autour de *B. subtilis* afin de développer des modules synthétiques visant à améliorer la production de métabolites et de protéines d'intérêt. Il a notamment permis de mettre en évidence que près de trois quart du génome de *B. subtilis* pouvait être dispensable et d'améliorer un modèle de prédiction métabolique (Tanaka *et al*, 2013). Ces projets ont mené à une meilleure compréhension et à une accumulation considérable de données sur *B. subtilis*, précieuses pour des études plus précises notamment du métabolisme et de sa régulation.

C'est ainsi qu'au cours de cette thèse je me suis intéressé à la régulation du métabolisme central du carbone chez *B. subtilis*, et dans un premier temps plus particulièrement au pyruvate. Ce métabolite, produit final de la glycolyse, où une molécule de glucose conduit à la formation de deux molécules de pyruvate, peut aussi être utilisé par *B. subtilis* comme seule source de carbone. Sa position particulière à la jonction entre la voie de la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie dit de « l'overflow », ainsi que son implication dans de nombreux processus cellulaires bactériens (régulation du métabolisme du carbone, division cellulaire, virulence chez certaines espèces) en font un élément clé, dont l'homéostasie est essentielle. Par ailleurs, le pyruvate présente un intérêt économique important dans les industries agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques et également pour la synthèse de produits chimiques et de polymères (Wieschalka *et al*, 2012). Malgré son importance, le mécanisme et la régulation du transport du pyruvate restent encore peu étudiés chez les bactéries en général, et étaient inconnus chez *B. subtilis*.

Je me suis également intéressé à la régulation exercée par la présence de malate dans le milieu sur l'entrée des sources "alternatives" de carbone. En effet, le malate est au même titre que le glucose une source préférentielle de carbone pour *B. subtilis*, mais la façon dont il régule le métabolisme reste peu connue.

Après une introduction sur le métabolisme central du carbone, je mettrai en évidence l'importance du pyruvate chez les procaryotes et les eucaryotes et son implication dans différents mécanismes du développement cellulaire. Enfin, la régulation du métabolisme central du carbone sera abordée et plus particulièrement les mécanismes de régulation de l'entrée des sources carbonées à l'intérieur de la cellule et de l'expression des gènes impliqués dans ce métabolisme. Le but n'est pas d'être exhaustif mais de donner un aperçu significatif des mécanismes principaux de régulation du métabolisme du carbone chez *B. subtilis*.

Introduction

I Transport des sources de carbone

B. subtilis se trouve naturellement dans le sol, un écosystème riche et complexe colonisé par quantité de microorganismes. Les racines des plantes notamment et la décomposition de matières organiques peuvent fournir des sources de carbone sous forme de polysaccharides, polypeptides ou de molécules carbonées plus simples. Les polysaccharides et polypeptides sont des sources importantes de carbone pour la cellule, mais sont bien souvent trop volumineux pour pouvoir être importés dans la bactérie. Ainsi ces grosses molécules sont d'abord dégradées par des enzymes extracellulaires produites par les nombreux microorganismes présents dans le sol. *B. subtilis* se trouve donc dans un milieu contenant des composés carbonés directement consommables ou qui doivent d'abord être dégradés pour être utilisables. Tous ces composés sont souvent dilués dans le milieu, n'ont pas une valeur énergétique équivalente et la consommation d'une grande partie d'entre eux ne permet pas une croissance optimale. Le transport de ces sources de carbone est donc une étape cruciale pour le développement optimal de la cellule. Les systèmes de transport membranaires jouent un rôle essentiel dans l'internalisation efficace des molécules, et ce de façon régulée. En général chaque type de molécules est pris en charge par un transporteur ou une perméase spécifique, ce qui permet son entrée de façon parfaitement contrôlée.

I.1 Les familles de transporteurs

Il existe quatre grands types de systèmes de transport décrits chez les bactéries (**Figure 2**) que l'on peut classer selon deux critères, le mode de translocation et la source d'énergie nécessaire à ce processus (Saier, 2000a; Saier *et al*, 2002a). On distingue le transport par diffusion facilitée, le transport utilisant l'énergie chimio-osmotique ou transport actif secondaire, le transport utilisant l'ATP (le transport actif primaire) comme source d'énergie et les systèmes de translocation dépendants du PEP (Saier *et al*, 2014).

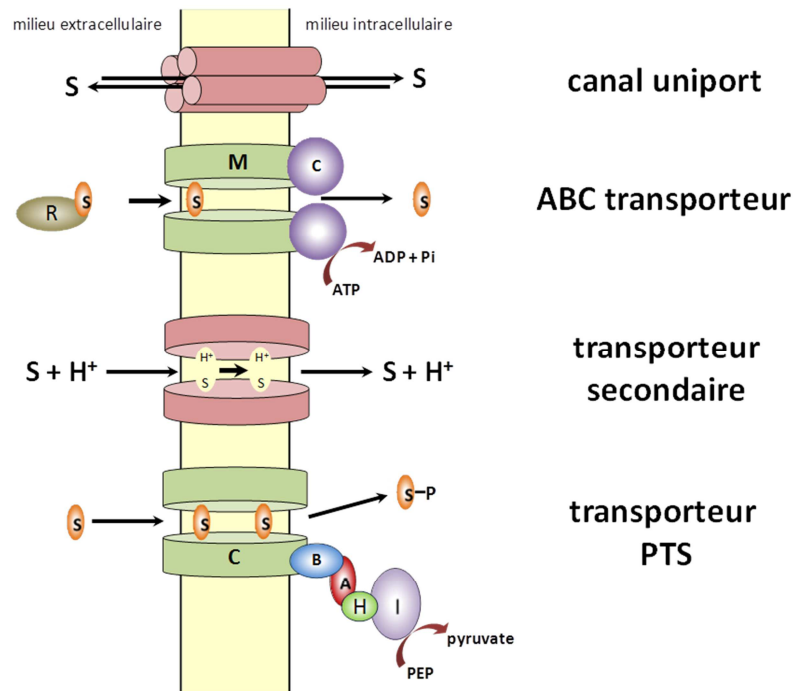


Figure 2 : Les quatre types de transporteur décrits chez les bactéries. Avec S représentant un substrat, R une protéine réceptrice, M un domaine transmembranaire perméase, C un domaine cytoplasmique ATPase, H^+ un proton, A un domaine cytoplasmique EIIA, B un domaine cytoplasmique EIIB, C un domaine membranaire EIIC, H une protéine HPr et l'enzyme EI. Adapté de Saier *et al.*, 2002.

Parmi ces quatre systèmes, le transport par diffusion facilitée se fait dans le sens du gradient de concentration, ou en fonction du potentiel de membrane, tandis que les trois autres permettent un transport contre ce gradient mais nécessitent l'utilisation d'énergie.

I.1.1 Le transport par diffusion facilitée

Cette catégorie regroupe les transporteurs de types canaux et permet la diffusion facilitée d'un soluté au travers de la membrane sans nécessiter d'énergie. Son fonctionnement est très proche de celui de la diffusion passive et n'est différent que par la nature enzymatique de son mécanisme. Il existe cinq types de canaux entrant dans cette catégorie classés selon leur structure, fonction, site d'action et taille (Saier, 2000b; Busch & Saier, 2002). Une molécule peut ainsi pénétrer dans la cellule suivant son gradient de concentration. Ce système de transport est utilisé pour l'entrée des polyols à chaîne linéaire tels que le glycérol, le ribitol ou l'arabitol.

I.1.2 Transport actif secondaire

Le transport actif secondaire utilise l'énergie chimio-osmotique fournie par un gradient électrochimique d'ions ou de solutés créé par une différence de concentration de la molécule en question de chaque côté de la membrane. Généralement cette énergie est produite par la force protomotrice ou par un gradient d'ions sodium allant de l'extérieur vers l'intérieur de la

cellule. D'autres ions tels que le lithium et le potassium sont également capables de fournir un gradient électrochimique suffisant pour permettre ce type de transport. Le transport secondaire consomme généralement moins d'énergie qu'un transport par transport actif primaire (Konings, 2006).

On distingue trois modes de transport secondaire chez les bactéries (Saier *et al*, 2002a; Konings, 2006) (**Figure 3**) :

- L'uniport, où une seule molécule est transportée à travers la membrane.
- Le symport entre un soluté et un cation. Dans ce cas le gradient ionique permet l'entrée du soluté et du cation dans le même sens.
- L'antiport entre un soluté et un cation ou entre deux solutés. Dans le premier cas, le gradient électrochimique va fournir l'énergie nécessaire pour l'expulsion d'un soluté hors du cytoplasme, permettant à la cellule de se débarrasser d'un composé toxique. Dans le deuxième cas, l'entrée ou la sortie d'un soluté suivant son gradient de concentration va favoriser la sortie ou l'entrée d'un second soluté.

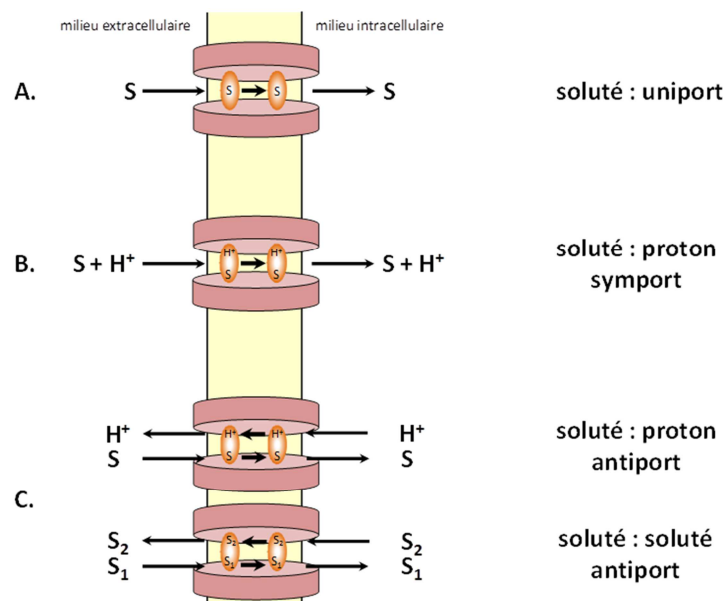


Figure 3 : Les mécanismes de transport secondaire décrits chez les bactéries. A. Le transport uniport d'un soluté (S) sans co-transport. B. Le transport par symport entre un soluté et un proton (H^+). C. Le transport par antiport soit entre un soluté et un proton, soit entre deux solutés (S_1 et S_2). Adapté de Saier *et al*, 2002

Parmi les transporteurs actifs secondaires, la super famille la plus importante est la MFS (Major Facilitator Superfamily). Les membres de cette super famille montrent une séquence protéique similaire contenant 12 ou 14 segments transmembranaires (Pao *et al*, 1998; Reddy *et al*, 2012). On la retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes et les archées et comprend des uniporteurs, des symporteurs et des antiporteurs. La MFS est

composée de soixante quatorze familles assurant le transport d'une grande variété de composés (des monosaccharides, des oligosaccharides, des acides aminés, des vitamines, des anions et cations organiques ou inorganiques, *etc.*) (Reddy *et al*, 2012).

Le transport actif secondaire est l'un des plus répandus chez les bactéries en général et le plus répandu chez *B. subtilis*, représentant plus de 60% des transporteur identifiés chez cette bactérie (Saier *et al*, 2002a, 2002b; Paulsen *et al*, 2000).

I.1.3 Le transport actif primaire ATP-dépendant

Ce type de transporteur utilise une source primaire d'énergie contrairement aux transporteurs secondaires qui utilisent l'énergie chimio-osmotique (énergie secondaire) (Busch & Saier, 2002). Cette source d'énergie peut être d'origine chimique, électrique ou solaire. Ainsi, l'ATP est le principal fournisseur d'énergie pour ce type de transport. Il existe cependant d'autres molécules dont la dégradation libère une énergie suffisante pour le transport actif d'un soluté.

La super famille des ABC transporteurs (ATP Binding Cassette) a été identifiée en 1986 aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes et montre un lien avec l'hydrolyse de l'ATP (Chen *et al*, 1986; Higgins *et al*, 1986; Higgins, 2001). Les transporteurs de cette super famille sont composés d'une protéine réceptrice et du transporteur en lui-même, composé de quatre domaines. La protéine réceptrice possède une forte affinité pour son substrat et le présente à la face externe du transporteur. Deux domaines transmembranaires du transporteur forment un passage pour le substrat et deux domaines cytoplasmiques sont capables de lier et d'hydrolyser l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP permet de fournir l'énergie pour le transport mais entraîne également un changement conformationnel des domaines transmembranaires, facilitant le déplacement du substrat (**Figure 2**). Selon la direction de la réaction, il est possible de distinguer deux sous-types parmi les transporteurs de cette super famille. Pour l'import, les domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont des chaînes de polypeptides séparées, alors que pour l'export ces deux types de domaines sont fusionnés (Hollenstein *et al*, 2007).

Il existe une grande variété de sous-familles de ce type de transporteurs chez les procaryotes (Paulsen *et al*, 2000). Cependant peu de sucres sont transportés par un tel système chez les bactéries (Saier, 2000b; Saier *et al*, 2002a), les principaux étant le maltose, le ribose le raffinose et le xylose.

Les ABC transporteurs et les MFS représentent près de 45% des transporteurs identifiés (Paulsen *et al*, 2000), suggérant que ce sont les deux plus grandes super familles chez les Procaryotes.

I.1.4 Transport PEP-dépendant

Ce système de transport a été découvert en 1964 chez *E. coli* (Kundig *et al*, 1964) comme un système utilisant le phosphoénolpyruvate (PEP) pour phosphoryler un certain nombre de carbohydrates concomitamment à leur entrée dans la cellule. Ce système, nommé PTS (phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system), a été mis en évidence chez un très grand nombre d'espèces bactériennes et plus récemment chez les archées, mais n'a pas été identifié chez les eucaryotes (Pickl *et al*, 2012; Cai *et al*, 2014; Saier Jr., 2015). Des études montrent que le système PTS est prédominant chez les bactéries pour le transport de sucres (Deutscher *et al*, 2002; Saier *et al*, 2002a). Cependant les transporteurs de ce type ne représentent qu'une faible partie de ceux présents chez *E. coli* et *B. subtilis* (Paulsen *et al*, 2000).

Ainsi, lors de l'entrée du sucre dans la cellule, une chaîne de réactions se met en place pour transférer un groupement phosphate du PEP vers ce sucre. Ce mécanisme est différent des trois précédemment cités où le substrat n'est pas modifié au cours de son transport.

C'est un système majeur pour le transport de sucre et la régulation du métabolisme du carbone chez *B. subtilis*. Son étude va donc être plus approfondie dans le chapitre suivant.

I.2 Les systèmes d'import des sources carbonées majeures chez les bactéries

I.2.1 Le système de transport PTS

Chez *B. subtilis* comme chez de nombreuses bactéries, les sucres simples de type hexose comme le glucose ou le fructose sont des sources de carbone privilégiées (Steinmetz, 1993). Bien que les sucres puissent être transportés par plusieurs transporteurs impliquant un ou plusieurs mécanismes différents, le PTS est le plus efficace. Par exemple, chez *B. subtilis* le glucose est majoritairement transporté par le PTS *via* le produit du gène *ptsG*, dont la délétion conduit à un très fort défaut de croissance en présence de glucose comme seule source de carbone (Gonzy-Tréboul *et al*, 1991; Bachem *et al*, 1997).

Au contraire, le transport des acides carboxyliques intermédiaires du cycle de Krebs (moins énergétiques) est effectué par des transporteurs de type secondaire (Saier *et al*, 2002a)

(cf chapitre I.2.2.2), tels CitM et CitH pour le citrate, DctP pour le fumarate et le succinate, ou encore MaeN pour le malate.

Le PTS est composé de plusieurs composants protéiques. Deux composants sont communs à tous les PTS, l'enzyme I (EI) et la protéine HPr. Les enzymes II (EII), sont spécifiques à chaque PTS et composées de trois à quatre domaines (IIA, IIB, IIC et parfois IID) codés par des gènes distincts. EI et HPr sont les deux premières enzymes impliquées dans la voie de phosphorylation permettant le transfert du phosphate du PEP au sucre. Les gènes codant pour Les enzymes EII sont généralement induits en présence des sucres qu'ils transportent. Ces enzymes sont membranaires et permettent la phosphorylation de leur sucre cible en utilisant le phosphate provenant de HPr au moment de l'entrée de ce sucre (Deutscher *et al*, 2006) (**Figure 4**).

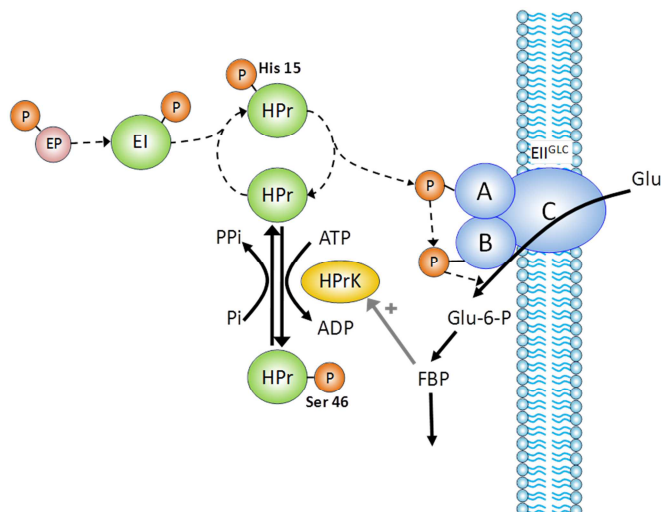


Figure 4 : Schéma de l'organisation générale du PTS chez *Bacillus subtilis*. Ici le transport du glucose est utilisé comme exemple pour la structure de l'enzyme II. Avec P-EP représentant le phosphoénolpyruvate, EI l'enzyme I, A l'enzyme IIA, B l'enzyme IIB, C l'enzyme IIC, HPrK l'HPr kinase, Glu le glucose, Glu-6-P le glucose-6-phosphate et FBP le fructose-1,6-bisphosphate. His 15 et Ser 46 représente les deux sites de fixation sur l'histidine 15 et la serine 46 du phosphate sur la protéine HPr. Le transfert de phosphate est représenté par des flèches pointillées. La flèche grise représente l'effet positif de la concentration de FBP sur l'activité de HPrK. Adapté de Görke et Stülke, 2008

Il est intéressant de constater que d'un point de vue énergétique, lors du transport d'un sucre PTS, un groupement phosphate provenant de la transformation du PEP en pyruvate est utilisé. Bien que l'énergie libre alors obtenue soit plus grande que celle issue de l'hydrolyse de l'ATP, pour la cellule le PEP peut être considéré comme une source d'énergie similaire à un ATP (Postma *et al*, 1993). En effet lors de la glycolyse, la transformation du PEP en pyruvate ne permet la formation que d'une molécule d'ATP. Ainsi, le coût du transport et de la phosphorylation par le PTS équivaut à l'utilisation d'une molécule d'ATP. Or, pour les sucres transportés par des systèmes non-PTS, l'utilisation de deux molécules d'ATP est nécessaire.

De fait, dans de très nombreux cas, une molécule d'ATP est consommée pour le transport du sucre au travers de la membrane, et une autre molécule est utilisée pour la phosphorylation puis la métabolisation de ce sucre. Le coût en énergie avec un système PTS est donc moindre. Ainsi le PEP est à la fois le donneur initial du groupement phosphate, mais également le fournisseur d'énergie pour le transport. A part le transfert du phosphate du PEP vers EI, toutes les réactions sont réversibles. De plus, la concentration de PEP dans le cytoplasme est liée à l'activité glycolytique et la présence de sucre dans le milieu. Cette concentration constitue donc le principal signal transduit *via* la cascade de phosphorylation. Le PTS est donc un système de transport médié par l'état de phosphorylation de ses composants (Postma *et al*, 1993)

Chez les bactéries à métabolisme anaérobie strict ou facultatif comme *B. subtilis*, la synthèse de l'ATP n'est pas efficace. Elles doivent donc contrôler strictement l'utilisation des molécules d'ATP générées et limiter leur gaspillage (Postma *et al*, 1993). Par son mécanisme, le PTS permet d'économiser une molécule d'ATP, ce qui est un avantage pour ce type d'organisme.

I.2.2 Les systèmes de transport non PTS

Chez *B. subtilis* les sources de carbone glycolytiques préférentielles sont transportées par un PTS (Glucose, fructose, saccharose, mannitol et tréhalose) (Saier *et al*, 2002a). Cependant, de nombreuses sources de carbone utilisent un système de transport appartenant à l'une des trois autres catégories.

I.2.2.1 Glucose et autres sources de carbone glycolytiques

Chez *B. subtilis*, il existe également un second transporteur du glucose, codé par le gène *glcP*. Ce transporteur fait partie de la super famille MFS, et plus particulièrement de la famille des symporteurs glucose/mannose:H⁺ (Paulsen *et al*, 1998). Parmi les sources de carbone glycolytiques, le glucose n'est pas le seul à pouvoir être transporté par un système non PTS. Ainsi, les sucres non PTS sont majoritairement transportés par des ABC transporteurs (mannose, arabinose, rhamnose, maltodextrine et galactotriose). Pour les sources de carbone glycolytiques autres que des sucres, telles que les polyols ou le gluconate, l'entrée dans la cellule est principalement prise en charge par des transporteurs secondaires (Saier *et al*, 2002a). Seul le glycérol est transporté par diffusion facilitée au travers de la membrane (Beijer *et al*, 1993; Froger & Delamarche, 2000) (table 1).

D'un point de vue énergétique, l'utilisation d'un transporteur non PTS est beaucoup moins "rentable" pour la cellule. En effet, le transport dans la cellule nécessite l'utilisation d'énergie (à l'exception du glycérol) sous forme d'ATP ou d'énergie chimio-osmotique. Une autre dépense d'énergie est ensuite requise pour permettre la phosphorylation du métabolite pour son utilisation dans la voie de la glycolyse.

1.2.2.2 Malate et autres sources de carbone gluconéogéniques

Il est possible pour les bactéries de croître en utilisant comme sources de carbone des acides du cycle de Krebs. Chez *B. subtilis*, tous les transporteurs identifiés correspondants sont des transporteurs secondaires. Un même transporteur a été identifié pour le fumarate et le succinate (Asai *et al*, 2000). Pour le citrate, le glutamate et le malate, au moins deux transporteurs ont pu être identifiés pour chacun (Tolner *et al*, 1995; Boorsma *et al*, 1996; Wei *et al*, 2000; Krom *et al*, 2001; Saier *et al*, 2002a; Tanaka *et al*, 2003).

Ces sources de carbone ne sont généralement pas préférentielles pour la croissance. Cependant, chez *B. subtilis*, le malate a un statut à part. En effet, il permet une croissance similaire à celle observée avec le glucose (Kleijn *et al*, 2010). Il existe quatre transporteurs identifiés pour le malate chez *B. subtilis*. Un premier transporteur codé par le gène *cimH*, permet le transport du citrate et du malate. CimH possède une forte affinité pour le citrate mais le transporte peu efficacement, tandis qu'il possède une faible affinité pour le malate mais le transporte avec une bonne efficacité (Krom *et al*, 2001). Un deuxième transporteur codé par le gène *mleN* catalyse l'antiport du H^+ -malate contre le Na^+ -lactate. Il a été proposé que ce transporteur jouerait un rôle dans l'entrée du malate et l'échange entre les ions Na^+ et H^+ dans des conditions faibles en oxygène ou avec une faible force proton motrice (Wei *et al*, 2000). MaeN et YflS, les deux autres transporteurs du malate identifiés, sont des symporteurs Na^+ -malate. Leurs gènes (respectivement *maeN* et *yflS*) sont les deux seuls codant pour des transporteurs du malate, spécifiquement induits en présence de malate (Tanaka *et al*, 2003). La délétion de *maeN* entraîne une perte de croissance sur milieu minimum avec le malate comme seule source de carbone, contrairement à la délétion de *yflS*. Ainsi, MaeN est considéré comme le transporteur principal du malate.

I.3 Le transport du pyruvate

Malgré son rôle central dans le métabolisme du carbone et ses liens avec de nombreux processus cellulaires, l'identification de gènes codant pour un transporteur du pyruvate n'en est qu'à ses débuts. Il est cependant connu depuis le milieu des années 1970, qu'il existe un transport actif du pyruvate à travers la membrane de la mitochondrie (Halestrap & Denton, 1974).

I.3.1 Chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, le pyruvate est initialement produit dans le cytosol de la cellule avant de rentrer dans la mitochondrie. Les caractéristiques cinétiques du transporteur impliqué sont connues depuis longtemps. Ainsi, on sait qu'il possède un K_m de 0.15 mM, dans la moyenne de ce que l'on retrouve pour les transporteurs mitochondriaux, et un V_{max} de 42 nmol.min⁻¹ par milligramme de protéine, bien plus faible que pour la majorité des transporteurs mitochondriaux (Halestrap, 1975). Cependant, ce n'est que récemment que le transporteur du pyruvate à travers la membrane mitochondriale a été identifié (Herzig *et al*, 2012; Bricker *et al*, 2012).

Chez les levures, le transporteur du pyruvate est composé de trois protéines homologues : Mpc1, Mpc2 et Mpc3. La forme active de ce transporteur est constituée d'un hétérodimère composé de Mpc1 associée à Mpc2 ou Mpc3 (Herzig *et al*, 2012). La délétion du gène *mpc1*, ou la double délétion *mpc2/mpc3* entraînent un défaut de croissance sur un milieu sans aminoacide. La double délétion *mpc2/mpc3* peut être complétée par l'expression de *mpc2* ou *mpc3*, tandis que la délétion de *mpc1* ne peut être complétée que par l'expression de *mpc1* (Herzig *et al*, 2012; Bricker *et al*, 2012). Cela indique que Mpc1 est essentielle pour le bon fonctionnement de ce complexe. En revanche, *mpc2* et *mpc3* ne sont pas exprimés dans les mêmes conditions, ce qui entraîne la formation de deux complexes alternatifs. Ainsi, *mpc2* se trouve exprimé lors d'une croissance dans des conditions de fermentation, et forme un complexe nommé MPC_{FERM}, tandis que *mpc3* est exprimé lors d'une croissance dans des conditions oxydatives, et forme un complexe nommé MPC_{OX} (Timoñ-Gómez *et al*, 2013; Bender *et al*, 2015). Enfin, l'étude *in vitro* des complexes MPC_{FERM} et MPC_{OX}, a révélé une activité de transport du pyruvate plus de deux fois supérieure pour MPC_{OX} que pour MPC_{FERM} (Bender *et al*, 2015).

Chez *Drosophila melanogaster* et les mammifères, il n'existe que deux homologues : Mpc1 et Mpc2. Ainsi, contrairement aux levures, la régulation de l'activité du complexe est

indépendante de sa composition (Rampelt & Laan, 2015). Il est également intéressant de noter que la délétion de *mcp1* chez la levure, peut être complétée par l'expression de *mpc1* de *Drosophila melanogaster* ou de l'Homme, indiquant que la fonction de Mpc1 a été conservée au cours de l'évolution (Bricker *et al*, 2012).

L'identification de ce transporteur a permis de mettre en évidence son rôle chez les cellules cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses comme les autres cellules à prolifération rapide, utilisent majoritairement la glycolyse et la fermentation pour obtenir de l'énergie. De plus, l'utilisation de cette voie permet la fabrication de métabolites nécessaires pour une croissance rapide (Schell *et al*, 2014; Vanderperre *et al*, 2015). Ainsi, en limitant fortement son entrée dans la mitochondrie, le pyruvate reste dans le cytoplasme et est utilisé par la glycolyse aérobie, caractéristique des cellules cancéreuses (Ferguson & Rathmell, 2008; Vander Heiden *et al*, 2009; Gray *et al*, 2013).

1.3.2 Chez les procaryotes.

Chez les procaryotes le transport du pyruvate reste encore peu étudié. Il est néanmoins connu que certains transporteurs MFS sont capables de le transporter (Saier, 2000a), et qu'il existe seulement deux transporteurs actifs secondaires identifiés pour cela; un chez *Rhizobium leguminosarum* et un chez *Corynebacterium glutamicum* (Hosie *et al*, 2002; Jolkver *et al*, 2009).

Chez *Rhizobium leguminosarum* une perméase présentant de fortes similarités avec la famille des symporteurs sodium/soluté est capable de transporter des monocarboxylates. Elle est notamment capable de transporter l'alanine, l'acétate, le propionate, ainsi que le lactate et le pyruvate avec une plus forte affinité. Les constantes de cinétique pour le transport du pyruvate ont été déterminées et montrent un K_m de 3.8 μM et un V_{max} de 9.8 $nmol.min^{-1}$ par milligramme de protéine (Hosie *et al*, 2002).

Enfin, le gène *mctP* codant pour ce transporteur, se situe juste en aval des gènes *mctS* et *mctR* codant pour un système à deux composants. La délétion de ces gènes entraîne une perte de l'expression de *mctP* indiquant que le système à deux composants MctSR est nécessaire pour l'activation de *mctP*. Cependant, l'expression de *mctP* reste élevée quel que soit le milieu testé et ne semble pas nécessiter la présence d'un inducteur (Hosie *et al*, 2002). Cela peut s'expliquer par une mutation dans le gène *mctS* qui rendrait l'activité de MctSR constitutive.

Chez *C. glutamicum* comme pour *Rhizobium leguminosarum*, le pyruvate est transporté par un transporteur actif secondaire capable de transporter d'autres monocarboxylates. Il appartient à la famille des symporteurs sodium/soluté, bien qu'il ne semble pas dépendre du potentiel électrochimique du sodium pour le transport (Jolkver *et al*, 2009). Ce transporteur, nommé MctC, est capable de transporter le pyruvate, l'acétate et le propionate.

Les caractéristiques cinétiques de ce transporteur suivent une équation de Hill, avec pour le transport du pyruvate un $K_{0.5}$ de 250 μM , un V_{\max} de 5.6 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ par milligramme de protéine, et une constante de Hill de 2.13. Les caractéristiques cinétiques pour le transport de l'acétate et du propionate sont respectivement : un $K_{0.5}$ de 31 μM , un V_{\max} de 143 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ par milligramme de protéine, et une constante de Hill de 1.30, et un $K_{0.5}$ de 9 μM , un V_{\max} de 14 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ par milligramme de protéine, et une constante de Hill de 3.65. Cela indique que MctP pourrait être un système d'import principalement pour l'acétate et le propionate, avec le pyruvate comme substrat additionnel (Jolkver *et al*, 2009).

L'expression du gène *mctC* est régulée en fonction des sources de carbone utilisées. Deux protéines régulatrices (RamA et RamB) possédant chacune un site de fixation en amont du promoteur de *mctC* jouent des rôles opposés dans sa régulation : RamA permet l'activation de *mctC* en présence de pyruvate, d'acétate ou de propionate, tandis que RamB exerce une répression faible sur l'expression de *mctC* en présence de glucose, pyruvate et acétate (Jolkver *et al*, 2009).

Chez *E. coli* le transporteur du pyruvate n'a pas été formellement identifié. Cependant, une étude utilisant un compétiteur toxique a montré qu'il existait au moins trois mécanismes différents pour ce transport, deux pour l'import (un inductible par le pyruvate et un exprimé de façon constitutive) et un pour l'excrétion (Lang *et al*, 1987; Kreth *et al*, 2013). Cependant aucun gène codant pour un de ces transporteurs n'a pu être mis en évidence.

Chez *B. subtilis* le système de transport du pyruvate n'était pas connu. L'identification et l'étude de ce transporteur ont fait l'objet d'une partie de notre travail et sont présentées dans la première partie de cette thèse.

II Métabolisme du carbone chez les bactéries

II.1 La glycolyse

II.1.1 Description générale

La glycolyse est une voie métabolique qui, comme son nom l'indique (du grec ancien "γλυκύς" : glycos qui signifie sucre et "λύσις" : lysis qui signifie dissolution), permet la dégradation des sucres. Identifiée et étudiée dès les années 1910 par Gustav Embden et Otto Meyerhof, elle est également nommée la voie d'Embden-Meyerhof. Elle consiste à dégrader une molécule de glucose (ou au sens plus large d'hexose et molécule apparentée) en deux molécules de pyruvate, par une série de réactions biochimiques et permet ainsi de produire de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) et de pouvoir réducteur sous forme de NADH (**Figure 5**). Le pyruvate est ensuite dégradé en différents produits selon le type d'organisme. Par exemple, lors de la fermentation alcoolique le pyruvate est dégradé en éthanol tandis que chez les bactéries lactiques il est dégradé en acide lactique. Il peut être également décarboxylé en acétyl-CoenzymeA (en acétyl-CoA) ou carboxylé en oxaloacétate pour fournir les deux précurseurs indispensables à l'activation du cycle de Krebs. La glycolyse est chez les bactéries la voie majoritaire d'utilisation des sucres et est commune à la fermentation et à la respiration oxydative. Lors d'une croissance sur un milieu dont la source de carbone entre au niveau du cycle de Krebs, le flux métabolique a la possibilité de "remonter" la glycolyse. Ce processus est appelé gluconéogenèse (cf chapitre II.1.3).

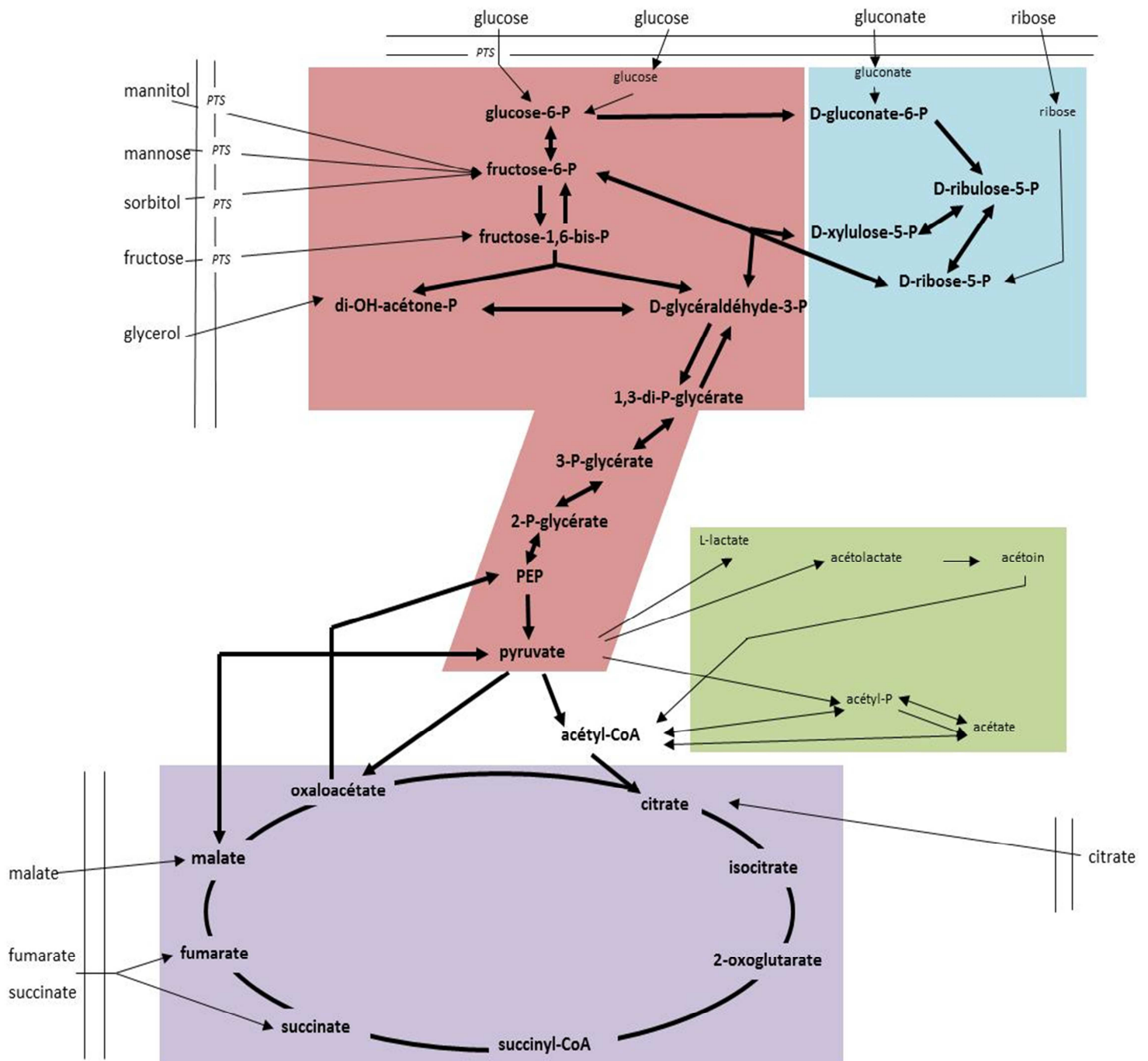


Figure 5 : Représentation schématique du métabolisme central du carbone chez *Bacillus subtilis*.
Les sources de carbones sont données à titre d'exemple.

■ Voie de la glycolyse et gluconéogenèse

■ Voie des pentoses phosphates

■ Cycle de Krebs

■ Voie de l'overflow

D'après Aymerich *et al*, 2007

II.1.2 Bilan de la glycolyse

Il est possible de décomposer la glycolyse en deux grandes parties. La première correspond aux quatre réactions enzymatiques permettant de transformer une molécule de glucose-6-phosphate en deux molécules de glyceraldéhyde-3-phosphate (**Figure 6**). Cette partie consommatrice d'énergie nécessite la consommation d'une molécule d'ATP pour la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate. Une autre dépense en énergie est également nécessaire en "amont" de la glycolyse pour la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate. Cette énergie peut provenir du PEP lors du transport du glucose par le PTS, où sous la forme d'une molécule d'ATP lors de la phosphorylation du glucose par la glucokinase GlcK (**Figure 6**). La deuxième partie de la glycolyse correspond aux cinq réactions enzymatiques, conduisant deux molécules de glyceraldéhyde-3-phosphate à deux molécules de pyruvate. Cette partie permet de produire de l'énergie. Pour chaque molécule de pyruvate obtenue, deux molécules d'ATP et une molécule de NADH sont produites.

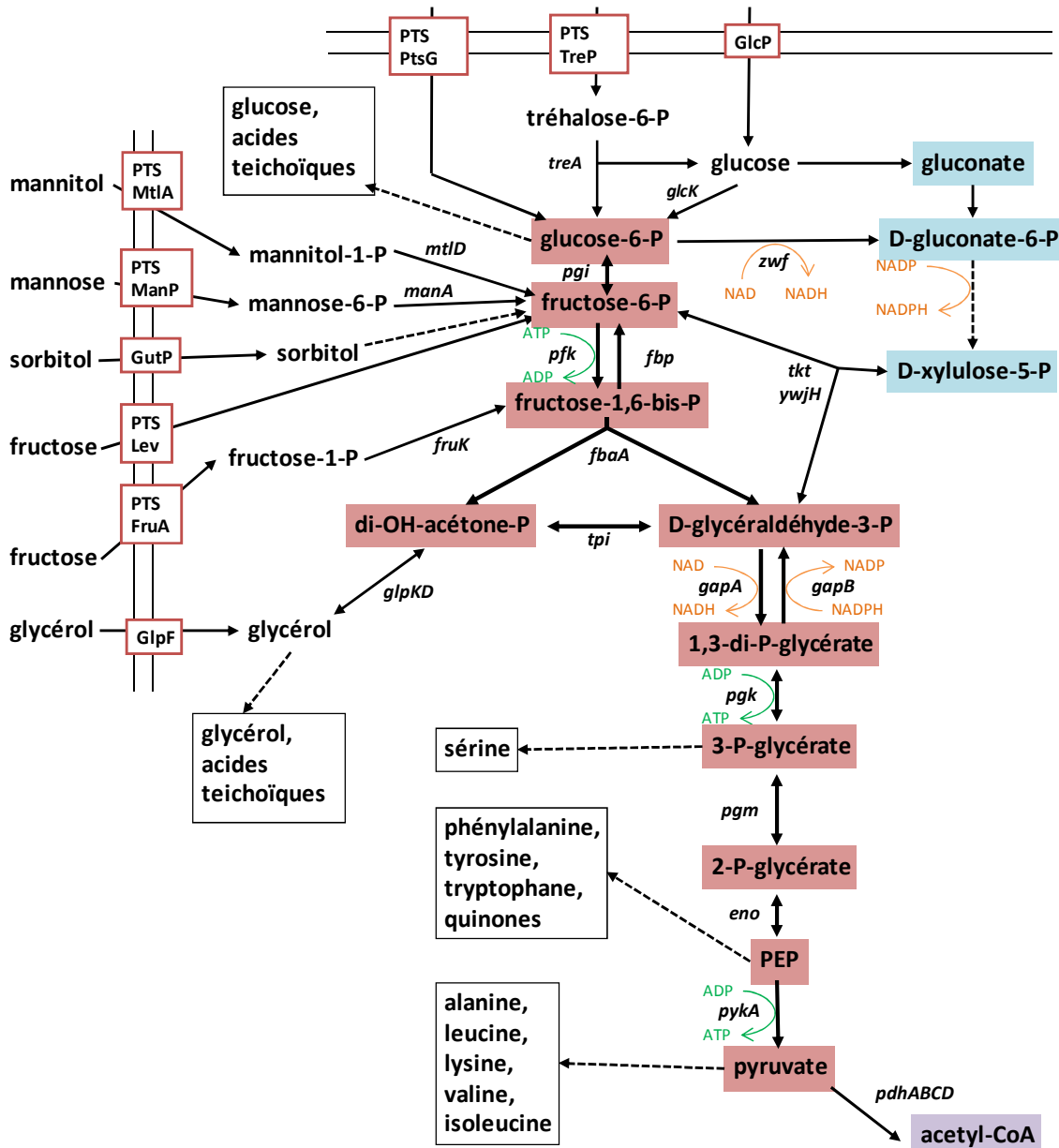
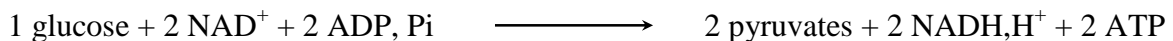


Figure 6 : La glycolyse chez *Bacillus subtilis*. En rouge sont représentés les principaux intermédiaires de la voie de la glycolyse, en bleu les intermédiaires de la voie des pentoses phosphates et en violet celui du cycle de Krebs. Les cadres noirs représentent les principales voies anaboliques liées à la glycolyse.

Chez *B. subtilis*, lors d'une croissance sur glucose, on peut considérer qu'une molécule de PEP sur les deux produites, va être utilisée par le système PTS pour la phosphorylation d'une nouvelle molécule de glucose lors de son entrée dans la cellule (von Wachenfeldt & Hederstedt, 2002). Ainsi, le bilan énergétique de la glycolyse dans ces conditions peut se résumer par l'équation suivante :



Cette équation met en évidence le faible rendement de la glycolyse, à l'issue de laquelle une grande partie de l'énergie se retrouve dans les molécules de NADH et de pyruvate produites. Les molécules de NADH sont une source importante de pouvoir réducteur qui peut être utilisée par la cellule pour produire de l'ATP lors de la respiration aérobie. Le pyruvate est aussi un métabolite très important car il permet notamment de produire de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate, deux métabolites initiant le cycle de Krebs à partir de la glycolyse (cf chapitre II.3). Le cycle de Krebs peut alors fournir de l'énergie et des intermédiaires importants de l'anabolisme. Lorsque la production de pyruvate est trop importante par rapport au besoin de la cellule, il peut alternativement être dégradé en lactate ou acétate par la voie de l'overflow (cf chapitre II.4).

II.1.3 Les enzymes spécifiques de la glycolyse ou de la gluconéogenèse

Lors d'une croissance en présence de sucres ou de polyols, la voie de la glycolyse est utilisée pour obtenir de l'énergie et conduit au pyruvate comme produit final. Elle permet également de fournir des précurseurs pour la voie des pentoses phosphates, liée à la première partie de la glycolyse et à partir de laquelle certaines molécules importantes pour la cellule sont obtenues. Des sources de carbone comme des acides peuvent entrer dans le métabolisme du carbone au niveau du cycle de Krebs (**Figure 6**). Il faut donc que le flux métabolique à partir de ces sources de carbone puisse "remonter" la voie de la glycolyse pour alimenter la voie des pentoses phosphates. La majorité des réactions de la glycolyse sont donc réversibles, à l'exception des quelques réactions où l'activité enzymatique est fortement régulée ou qui, dans les conditions physiologiques et thermodynamiques de la cellule, ne sont catalysées que dans un seul sens. Ainsi, il existe un certain nombre d'enzymes spécifiques de la glycolyse ou de la gluconéogenèse (Gerhard, 1998).

II.1.3.1 La 6-phosphofructokinase *PfkA*

La 6-phosphofructokinase (Pfk) catalyse la conversion du fructose-6-phosphate (F6P) en fructose-1,6-bisphosphate (FBP). Cette réaction est la deuxième de la voie de la glycolyse et nécessite la consommation d'énergie sous forme d'ATP. Elle peut également utiliser comme donneur de groupement phosphate le pyrophosphate chez certaines plantes, eucaryotes primitifs, bactéries et archées, ou l'ADP (adénosine diphosphate) chez les archées hyperthermophiles (Ronimus & Morgan, 2001). La Pfk ne catalyse pas la conversion du FBP en F6P et est donc spécifique de la voie de la glycolyse. Du fait de sa position stratégique dans la glycolyse et de sa consommation d'énergie, elle joue un rôle primordial dans le contrôle du flux métabolique.

Il existe trois isoformes différentes de Pfk : l'isoforme PfkA, ATP-dépendante majoritaire chez les eucaryotes supérieurs et certains procaryotes, ou pyrophosphate-dépendante chez les plantes ; l'isoforme PfkB, ATP-dépendante, existant chez les bactéries et une isoforme PfkC qui comprend les phosphofructokinases ADP-dépendantes que l'on retrouve chez les hyperthermophiles (Ronimus & Morgan, 2001).

B. subtilis possède l'isoforme PfkA ATP-dépendante. Le gène *pfkA* codant pour cette phosphofructokinase est le premier d'un opéron contenant également le gène *pykA* codant pour la pyruvate kinase. La délétion de *pfkA* entraîne un fort défaut de croissance sur milieu minimum avec le glucose comme seule source de carbone, mais entraîne également un quasi doublement du temps de génération lors de la croissance sur un milieu riche (Muñoz-Márquez & Ponce-Rivas, 2010). De façon intéressante, le mutant correspondant présente un taux de sporulation plus élevé que la souche sauvage dans les premiers temps de la sporulation (Muñoz-Márquez & Ponce-Rivas, 2010).

II.1.3.2 Les fructose-1,6-bisphosphatases Fbp et GlpX

La fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) est une enzyme qui catalyse la déphosphorylation du FBP en F6P. Il existe trois classes de FBPases. La classe I se retrouve chez les eucaryotes et chez *E. coli*. La classe II, que possède également *E. coli*, se retrouve chez les procaryotes et très rarement chez les eucaryotes. Il existe une troisième classe (classe III) différentes des deux autres que l'on ne retrouve principalement que chez les firmicutes (Fujita *et al*, 1998; Jules *et al*, 2009). La FBPase est la deuxième enzyme spécifique de la gluconéogenèse.

Chez *B. subtilis* l'enzyme Fbp (classe III) permet la conversion du FBP en F6P. Cette enzyme est exprimée de façon constitutive et nécessite la présence d'ions manganèses pour son activité (Fujita & Freese, 1979). Cette activité peut être activée par le PEP, et inhibée par de nombreux composés phosphorylés (Fujita & Freese, 1979). Cependant la délétion du gène *fbp* n'abolit pas la croissance du mutant sur des sources de carbone gluconéogéniques (Fujita & Freese, 1981). Cela est dû au fait qu'il existe une deuxième FBPase chez *B. subtilis*, GlpX (FBPase de classe II), dont le gène est transcrit de façon similaire en croissance sur des sources de carbone glycolytiques ou gluconéogéniques (Jules *et al*, 2009). Néanmoins, l'activité de GlpX est inhibée *in vitro* par l'addition de PEP à des concentrations similaires à celle observée dans la cellule lors d'une croissance sur malate. Cette apparente contradiction

peut s'expliquer par le fait que la concentration de PEP nécessaire pour inhiber totalement GlpX est plus importante *in vivo* (Jules *et al*, 2009).

II.1.3.3 Les glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases Gap

Les glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases (GAPDH) catalysent l'interconversion du glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P) en 1,3-diphosphoglycerate (1,3-DPG) et utilisent le NAD(P)^+ comme cofacteur. Chez toutes les espèces étudiées, la GAPDH possède une séquence bien conservée (Figge *et al*, 1999). Cette enzyme est particulièrement bien caractérisée au niveau structural et biochimique (Zwickl *et al*, 1990; Korndörfer *et al*, 1995; Talfournier *et al*, 1999; Roitel *et al*, 1999, 2002; Fillinger *et al*, 2000; Didierjean *et al*, 2003; Ferreira-da-Silva *et al*, 2006; Markossian *et al*, 2006; Jia *et al*, 2011). Sa forme active est tétramérique. Chez les plantes et les cyanobactéries, il existe deux GAPDH fortement similaires entre elles. La première, GapC chez les plantes et Gap1 chez les cyanobactéries, est cytoplasmique, strictement NAD-dépendante et son activité est impliquée dans la glycolyse et la gluconéogenèse. La deuxième, GapAB chez les plantes, est chloroplastique, NADP-dépendante (mais peut également utiliser le NAD), et est impliquée dans le processus d'assimilation du CO_2 au cours de la photosynthèse (Figge *et al*, 1999); Gap2, chez les cyanobactéries, peut elle aussi utiliser le NAD^+ et le NADP^+ comme cofacteur avec une préférence pour le NADP. Cette enzyme montre une activité dans le cycle de Calvin (Koksharova *et al*, 1998).

Chez *B. subtilis*, il existe deux gènes codant pour deux GAPDH. Le gène *gapA*, qui avait d'abord été identifié et séquencé (Viaene *et al*, 1989), et le gène *gapB*, identifié suite au séquençage et à l'analyse complète du génome (Kunst *et al*, 1997). Il a ensuite été montré que ces deux gènes avaient des fonctions différentes : GapA, spécifique de la glycolyse, ne catalyse que la formation de 1,3-DPG à partir de G3P dans les conditions physiologiques de la cellule, tandis que, GapB est spécifique de la gluconéogenèse et ne catalyse que la formation de G3P à partir de 1,3-DPG. Ces deux enzymes sont également différenciées par leur cofacteur, GapA utilisant le NAD^+ et GapB le NADP^+ (Fillinger *et al*, 2000).

Il est également connu que la GAPDH peut avoir d'autres rôles au sein de la cellule. Notamment, elle peut être retrouvée à la surface cellulaire pour jouer le rôle de protéine de liaison avec la plasmine (Gil-Navarro *et al*, 1997; Hughes *et al*, 2002; Bergmann *et al*, 2004). Il a également été montré qu'elle était capable de se lier à l'ARN sur des régions riche en adénine et uracile (Nagy *et al*, 2000; Bonafe, 2005).

II.2 La voie des pentoses phosphates

II.2.1 Description générale

La voie des pentoses phosphates est une alternative au début de la glycolyse permettant également la conversion du glucose-6-phosphate en F6P et G3P tout en assurant la synthèse de précurseurs importants pour la cellule (**Figure 7**). On peut décomposer cette voie en deux parties ayant des fonctions différentes.

La première partie est la branche oxydative et convertit du glucose en ribulose-5-phosphate. Cette conversion permet de produire du pouvoir réducteur sous la forme de deux molécules de NADPH, qui sont utilisées dans les voies de biosynthèse, notamment celles des acides gras. La deuxième partie est la branche non-oxydative et consiste en la conversion du ribulose-5-phosphate en F6P, G3P et érythrose-4-phosphate. Au cours de cette partie, du ribose-5-phosphate va également être produit. L'érythrose-4-phosphate, va être utilisé comme précurseur dans la synthèse du noyau aromatique, que l'on retrouve dans des quinones et dans certains acides aminés (**Figure 7**). Il sert en particulier de précurseur pour la biosynthèse de l'histidine, du tryptophane, de la thiamine, du NAD^+ et des nucléotides.

Certaines sources de carbone ne sont utilisables qu'à partir de la voie des pentoses phosphates ; c'est le cas notamment du gluconate et de sucres tels que l'arabinose, le xylose et le ribose.

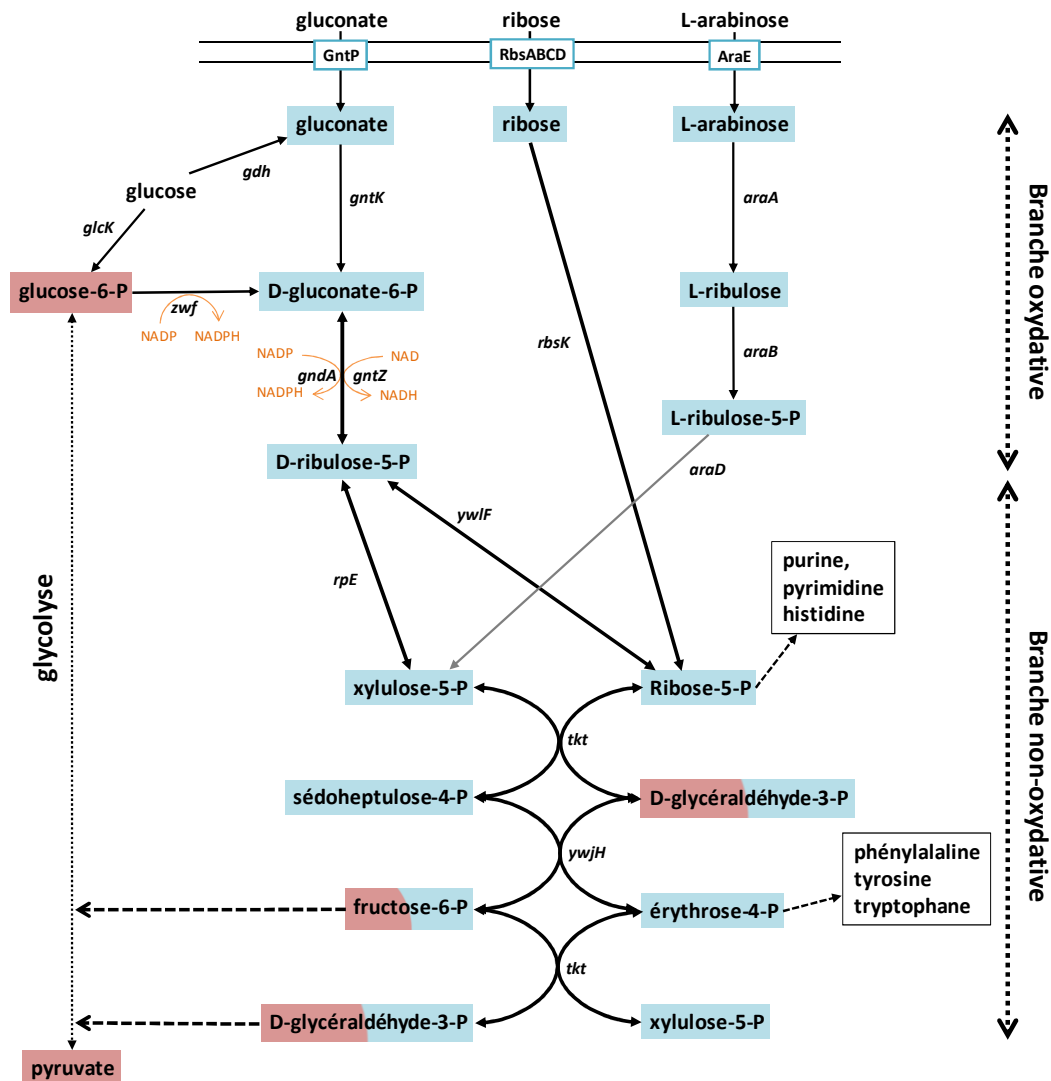


Figure 7 : Voie des pentoses phosphates chez *Bacillus subtilis*. Les rectangles bleus représentent les intermédiaires de la voie des pentoses phosphates, les rouges ceux de la glycolyse et les rectangles rouges et bleus représentent les intermédiaires communs aux deux voies.

II.3 Le cycle de Krebs

II.3.1 Description générale

Le cycle de Krebs, également appelé cycle des acides tricarboxyliques, fut entièrement décrit en 1937 par Hans Adolf Krebs (Krebs & Johnson, 1937), bien que certaines parties avaient déjà été découvertes dans les années 1930 par Albert Szent-Györgyi (Szent-Györgyi, 1937). Il est le point final du catabolisme du glucose, des acides gras et de nombreux acides aminés et est composé de huit étapes enzymatiques. La première consiste à transférer un groupement acétyl provenant de l'acétyl-CoA sur une molécule d'oxaloacétate pour former une molécule de citrate. Cette molécule de citrate va ensuite être transformée au cours du cycle, conduisant à deux décarboxylations et la régénération d'une molécule d'oxaloacétate (**Figure 8**). Au cours de ces étapes, le cycle de Krebs va permettre la production d'énergie,

soit directement (avec la production d'une molécule d'ATP ou de GTP), soit indirectement en fournissant du pouvoir réducteur qui sera utilisé par la respiration oxydative.

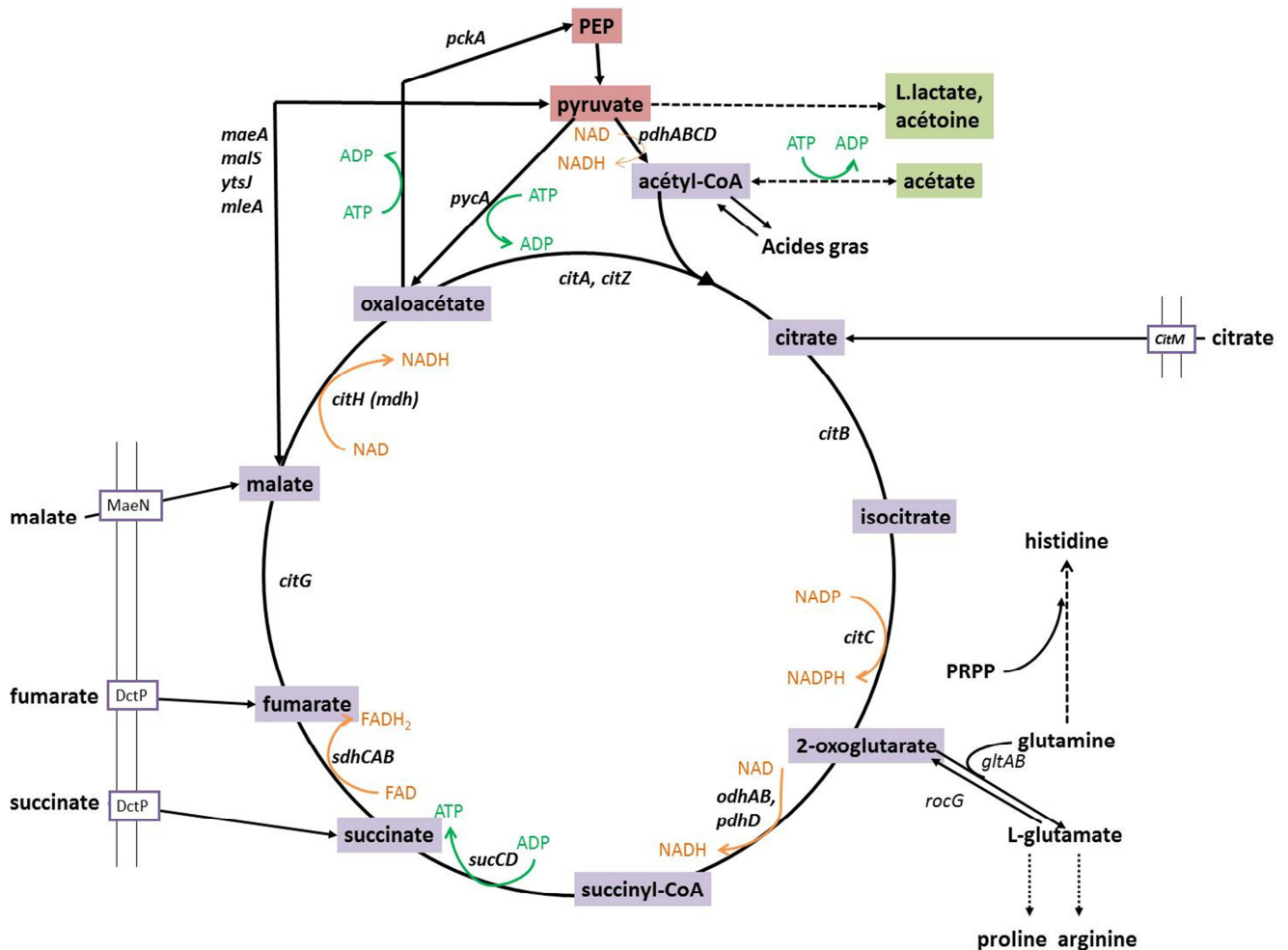


Figure 8 : Cycle de Krebs et les voies s'y rattachant chez *Bacillus subtilis*. Les rectangles violets représentent les intermédiaire du cycle de Krebs, en rouge ceux de la voie de la glycolyse et en vers ceux de la voie de l'overflow. D'après Sonenshein, 2002.

Lorsque la cellule a suffisamment d'énergie disponible, certains des intermédiaires du cycle de Krebs peuvent être utilisés comme précurseurs pour la fabrication d'acides aminés, de nucléotides et des porphyrines (Berg *et al*, 2002). Ainsi, Le 2-oxoglutarate permet d'obtenir du glutamate, un métabolite à la jonction entre le métabolisme du carbone et le métabolisme de l'azote et précurseur important pour de nombreuses molécules. Le glutamate peut également être obtenu par assimilation directe ou par l'assimilation de glutamine ou d'ammonium. Le succinyl-CoA peut être utilisé comme précurseur pour la formation de porphyrines, et l'oxaloacétate est un précurseur de l'aspartate. L'utilisation de ces intermédiaires conduit à une déplétion du cycle de Krebs, nécessitant une réalimentation pour continuer la production d'énergie. Les réactions qui permettent cette réalimentation sont qualifiées d'anaplerotiques (Owen *et al*, 2002). Nous pouvons considérer trois de ces

réactions comme étant majeures : la réaction catalysée par la pyruvate carboxylase, qui permet d'obtenir de l'oxaloacétate à partir de pyruvate, celle catalysée par la PEP carboxylase qui permet d'obtenir de l'oxaloacétate à partir de PEP et celle catalysée par l'enzyme malique qui permet de produire du pyruvate à partir du malate. Le pyruvate ainsi obtenu sera alors converti en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. Il est à noter que la PEP carboxylase n'est pas présente chez *B. subtilis*. Ces réactions seront traitées dans le chapitre II.5.1.

Au cours d'un cycle complet lors d'une croissance aérobie, la cellule est capable de produire une molécule de GTP/ATP lors de la réaction catalysée par la succinyl-CoA synthétase. Chez *B. subtilis*, cette enzyme semble être ADP-dépendante car aucune activité en présence de GDP n'a été détectée (Weitzman & Jaskowska-Hodges, 1982). La cellule est également capable de produire du pouvoir réducteur sous forme de nucléotides réduits au cours de quatre réactions. Chez *B. subtilis* L'isocitrate déshydrogénase permet de fournir une molécule de NADPH, la succinate déshydrogénase fournit une molécule de FADH₂ et enfin, la 2-oxoglutarate déshydrogénase et la malate déshydrogénase vont chacune produire une molécule de NADH (**Figure 8**).

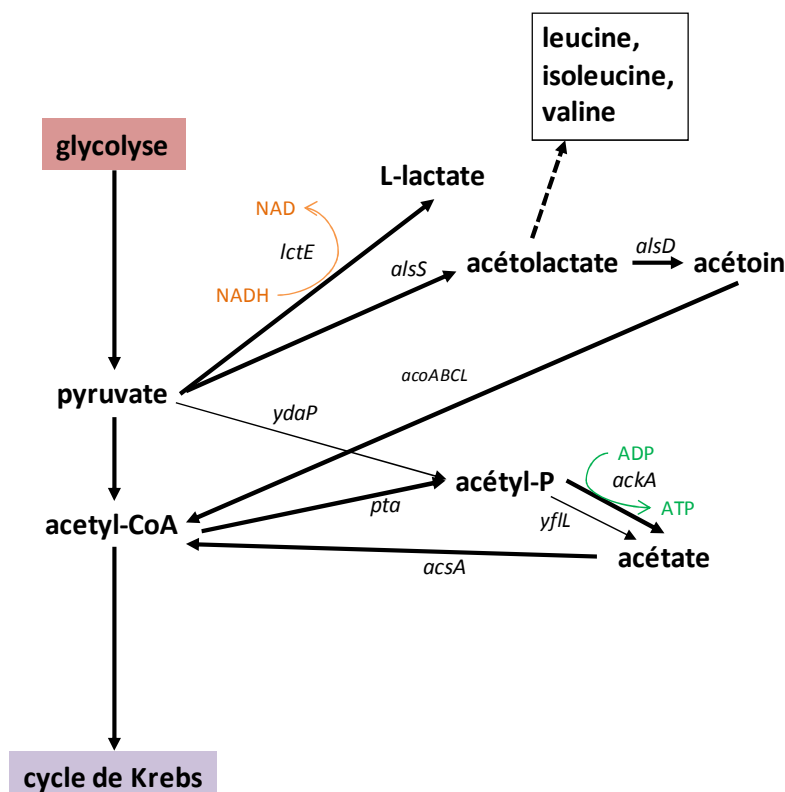
Le cycle de Krebs est la principale voie d'entrée des sources de carbone gluconéogéniques. Au cours du cycle, les substrats sont convertis en oxaloacétate, qui est alors transformé en PEP par la phosphoénolpyruvate carboxykinase. Chez *B. subtilis*, c'est le point d'accès principal pour atteindre la gluconéogénèse.

Chez *B. subtilis* il a également été montré que les enzymes du cycle de Krebs étaient capables de former un métabolon pour faciliter leurs actions (Meyer *et al*, 2011a). Les métabolons sont des complexes supramoléculaires constitués d'éléments structuraux et d'enzymes consécutives d'une voie de biosynthèse. De telles structures offrent de nombreux avantages pour l'organisation et l'efficacité des voies métaboliques et du métabolisme dans son ensemble. Le corps de ce métabolon est constitué des trois enzymes citrate synthase, isocitrate déshydrogénase et malate déshydrogénase, mais peut aussi se lier à d'autres enzymes du cycle de Krebs ou périphériques à celui-ci (Meyer *et al*, 2011a). Enfin, il est connu que les enzymes de ce cycle ont un rôle dans la sporulation (Sonenshein *et al*, 2002).

II.4 La voie de l'overflow

La voie de l'overflow dérive du métabolisme central du carbone à partir du nœud du pyruvate et permet la synthèse de produits, tels que le lactate, l'acétate et l'acétoïne qui

pourront ensuite être excrétés par la cellule (Contiero *et al*, 2000; Sonenshein, 2007; Nahku *et al*, 2010). Cette voie est utilisée lorsque la cellule se trouve dans un milieu contenant une source de carbone permettant une croissance rapide (comme le glucose), et que cette source de carbone est présente en excès. Dans ces conditions, seule une faible partie du pyruvate et de l'acétyl-CoA produits intègre le cycle de Krebs, entraînant leur accumulation dans la



cellule. Pour pallier à cette accumulation, la cellule va utiliser la voie de l'overflow (Sonenshein, 2007; Aymerich *et al*, 2007) (**Figure 9**). Chez *B. subtilis* cette voie peut aussi être utilisée lors de la fermentation du glucose en présence de pyruvate ou d'acides aminés, ou lors d'une croissance avec une respiration anaérobie (Wolfe, 2005).

Figure 9 : Voie de "l'overflow" chez *Bacillus. subtilis*. Représentation schématique des enzymes et métabolites de la voie de l'overflow. Avec en rouge la voie de la glycolyse, en violet le cycle de Krebs.

Chez *B. subtilis* la voie de l'overflow est strictement régulée (cf chapitres III.2.3 et III.3.1) et le flux métabolique y est dirigé lors d'une croissance dans un milieu riche (Aymerich *et al*, 2007). Lors d'une croissance avec le malate comme source de carbone, le pyruvate devient également un composé sécrété (Kleijn *et al*, 2010).

II.5 Le pyruvate : un métabolite central

Le pyruvate, ou son acide associé l'acide pyruvique, est le plus simple des cétoacides. Il est composé d'un groupement carboxyl et d'un groupement cétone. Sa position, au cœur du

métabolisme central du carbone, en fait un métabolite important pour de nombreux processus cellulaires.

II.5.1 Le nœud du pyruvate

A la jonction entre la glycolyse/gluconéogenèse et le cycle de Krebs se trouve un nœud métabolique important composé du PEP, du pyruvate et de l'oxaloacétate. Ce nœud est également appelé le nœud anaplérotique. Il est composé d'un jeu de réactions permettant d'orienter le flux du métabolisme central du carbone dans la direction appropriée, en fonction des sources de carbone disponibles, et sert ainsi de commande pour la direction du flux (Sauer & Eikmanns, 2005). C'est également à ce niveau que vient se brancher la voie de l'overflow. Chez *B. subtilis* il existe quatre réactions à cette jonction.

II.5.1.1 Le complexe pyruvate déshydrogénase PdhABCD

Le complexe pyruvate déshydrogénase (Pdh) catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA et CO₂. C'est une réaction irréversible qui permet de former du NADH (**Figure 8**). Ce complexe fait partie de la famille des 2-oxo-acide déshydrogénases et est composé chez les procaryotes comme chez les eucaryotes de trois enzymes (Gao *et al*, 2002; Patel *et al*, 2014). La première (l'enzyme E1) est une pyruvate déshydrogénase qui catalyse la décarboxylation du pyruvate et entraîne la formation d'un intermédiaire ainsi que l'acétylation du groupement lipoyl attaché à la deuxième enzyme (E2). Celle-ci est une dihydrolipoamide acétyltransférase qui catalyse le transfert du groupement acétyl vers le coenzyme A pour former l'acétyl-CoA. La troisième enzyme (E3) est une dihydrolipoamide déshydrogénase permettant le transfert d'électron pour obtenir du NADH (Patel *et al*, 2014). Les différentes enzymes du complexe pyruvate déshydrogénase sont très bien conservées parmi les différentes espèces (Hemila *et al*, 1990). Chez les bactéries à Gram négatif, E1 est composée d'un homodimère tandis que pour les bactéries à Gram positif, elle est composée d'un hétérotetramère (E1 α par deux et E1 β par deux) (Gao *et al*, 2002).

Chez *B. subtilis* ce complexe est codé par l'opéron *pdhABCD* avec les gènes codant respectivement les sous-unités E1 α , E1 β , l'enzyme E2 et l'enzyme E3. Dans un milieu de croissance avec du succinate comme source de carbone et du glutamate comme source d'azote, l'expression de cet opéron semble légèrement induite lorsque du glucose est ajouté. Cependant, son expression est plus forte en présence de malate qu'en présence de glucose lors d'une croissance sur milieu minimum (Doan *et al*, 2003; Sauer & Eikmanns, 2005).

Il est également connu que la sous-unité E1 β et l'enzyme E2 sont impliquées dans les étapes II et III de la sporulation, et que cette implication n'est pas liée à leur activité enzymatique (Gao *et al*, 2002). Récemment il a aussi été montré que la sous-unité E1 α était impliquée dans la division cellulaire (Monahan *et al*, 2014) (cf Chapitre II.5.3).

II.5.1.2 La pyruvate carboxylase *PycA*

La pyruvate carboxylase catalyse la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate. Cette réaction est irréversible et nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP et l'utilisation de CO₂. Elle utilise également la biotine comme cofacteur. Chez de nombreuses espèces bactériennes cette enzyme est activée de façon allostérique par l'acétyl-CoA et inhibée par l'aspartate, le 2-oxoglutarate, l'AMP et l'ADP (Sauer & Eikmanns, 2005). Elle est en général composée d'un homotétramère, mais chez certaines bactéries elle présente une structure composée de deux sous-unités différentes (Sauer & Eikmanns, 2005).

Chez *B. subtilis* la pyruvate carboxylase est le produit du gène *pycA*. Elle est essentielle pour l'initiation du cycle de Krebs car elle permet de produire de l'oxaloacétate, substrat indispensable pour la citrate synthase en catalysant la première réaction (Diesterhaft & Freese, 1973). Une source de carbone entrant dans le métabolisme en amont du pyruvate ne permet pas la croissance d'un mutant de délétion de *pycA* (Diesterhaft & Freese, 1973). Il a également été montré que pour certaines souches de *B. subtilis*, la délétion de *pycA* pouvait être compensée par une activité inverse de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Zamboni *et al*, 2004; Sauer & Eikmanns, 2005). Cette complémentarité ne se retrouve pas dans la souche de référence 168 de *B. subtilis* (Zamboni *et al*, 2004).

II.5.1.3 La phosphoénolpyruvate carboxykinase *PckA*

La phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEP carboxykinase) catalyse l'interconversion de l'oxaloacétate en PEP en produisant une molécule de CO₂. Il existe deux types de PEP carboxykinases qui peuvent être soit ATP-dépendante soit GTP-dépendante. Elle utilise également un ion Mg²⁺ ou un ion Mn²⁺ comme cofacteur (Delbaere *et al*, 2004; Sauer & Eikmanns, 2005). Cette réaction est considérée comme réversible, même si cela est extrêmement défavorable dans les conditions physiologiques. La forme GTP-dépendante, monomérique, est la forme que l'on retrouve majoritairement chez les animaux. La forme ATP-dépendante est prédominante chez les plantes, les champignons et les bactéries. Elle est la première enzyme qui permet l'entrée dans la voie de la gluconéogenèse (Sauer & Eikmanns, 2005).

Chez *B. subtilis* la PEP carboxykinase est de la forme ATP-dépendante et est codée par le gène *pckA*. La délétion de ce gène n'entraîne pas de perte de croissance en utilisant le glucose comme seule source de carbone (Tännler *et al*, 2008; Meyer & Stülke, 2013). En revanche, un tel mutant est incapable de croître avec le malate comme seule source de carbone (Meyer & Stülke, 2013). Du fait de son importance dans la gluconéogenèse, l'expression de *pckA* est très bien contrôlée (cf chapitre III.3.2.2).

II.5.1.4 Les enzymes maliques *MaeA*, *Mals*, *MleA* et *YtsJ*

Les enzymes maliques sont NAD(P)-dépendantes et catalysent l'interconversion du malate en pyruvate. Il existe trois classes d'isoenzymes définies en fonction de leur cofacteur et de leur capacité à catalyser la décarboxylation de l'oxaloacétate en pyruvate (Voegele *et al*, 1999). Ces enzymes sont bien connues et étudiées (Murai & Tokushige, 1971; Kawai *et al*, 1996; Voegele *et al*, 1999; Doan *et al*, 2003; Lerondel *et al*, 2006; Meyer & Stülke, 2013). En combinaison avec la pyruvate carboxylase, les enzymes maliques peuvent contribuer à la production d'oxaloacétate à partir de malate, même en absence de malate déshydrogénase (**Figure 8**), ce qui permet de compléter le cycle de Krebs et d'initier la gluconéogenèse par la Phosphoénolpyruvate carboxykinase (**Figure 8**). En combinaison avec le complexe pyruvate déshydrogénase elles permettent de fournir de l'acétyl-CoA, lui aussi indispensable pour amorcer le cycle.

Chez *B. subtilis* il existe quatre gènes paralogues codant pour des enzymes maliques. Les gènes *maeA*, *malS* et *mleA* codent pour trois enzymes NAD-dépendantes, et le gène *ytsJ* code pour une enzyme NADP-dépendante. Un seul de ces gènes est spécifiquement induit en présence de malate : le gène *maeA* (Doan *et al*, 2003). Il se trouve en opéron avec un gène de fonction inconnue *ywkB*. De façon surprenante la délétion de *maeA* n'entraîne pas de perte de croissance avec le malate comme seule source de carbone, indiquant qu'il n'est pas essentiel pour l'utilisation de celui-ci (Doan *et al*, 2003). Le gène *mleA* peut également être induit, mais dans des milieux complexes, tandis que *ytsJ* et *malS* ont une expression constitutive (Lerondel *et al*, 2006; Nicolas *et al*, 2012). Enfin, les quatre enzymes maliques sont produites au cours de la phase de germination des spores, afin d'utiliser le malate stocké dans celles-ci (Sinai *et al*, 2015).

Seule YtsJ semble importante pour la croissance avec le malate comme seule source de carbone. En effet, la délétion de *ytsJ* entraîne un défaut de croissance dans ces conditions, contrairement à la délétion des autres enzymes maliques (Lerondel *et al*, 2006). Cela est

probablement dû au fait que YtsJ est la seule des quatre paralogues capable de produire du NADPH. En dehors des enzymes maliques et de l'isocitrate déshydrogénase, la seule source importante de ce cofacteur se trouve au niveau de la voie des pentoses phosphates. Or, lors d'une croissance sur des sources de carbone gluconéogéniques, le flux atteignant cette voie est très faible. Ainsi, le seul moyen pour la cellule de maintenir son niveau de NADPH se situe au niveau de l'enzyme malique NADP-dépendante. Néanmoins, l'expression des gènes codant pour les enzymes NAD-dépendantes reste importante, car elle permet de maintenir le taux d'ATP intracellulaire lors d'une croissance avec du malate (Meyer & Stülke, 2013).

II.5.2 Rôle du pyruvate dans la régulation du métabolisme

La régulation du métabolisme central du carbone est en partie allostérique. Ainsi, chez *B. subtilis*, le pyruvate a un effet négatif sur l'activité de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FbaA) (Ujita, 1978), qui catalyse la conversion réversible du fructose-1,6-bisphosphate (FBP), en dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P). Bien que l'expression de *fbaA* soit constitutive (Ludwig *et al*, 2001), la présence de pyruvate est capable d'inhiber l'activité de FbaA dans le sens de la catalyse du FBP vers le DHAP et le G3P (Ujita, 1978). Chez *E. coli*, le pyruvate permet d'activer de façon allostérique l'activité de la fructose-1,6-bisphosphatase (Link *et al*, 2013). Il sert également de senseur lors de la transition d'une croissance anaérobie à une croissance en micro-aérobie. Au cours de cette transition le pyruvate s'accumule et peut se lier au régulateur transcriptionnel PdhR, permettant une dérégulation de ses gènes cibles et la reprogrammation du métabolisme pour une croissance en aérobiose (Trotter *et al*, 2011).

II.5.3 Rôle du pyruvate dans le devenir de la cellule

Chez *B. subtilis*, le pyruvate joue un rôle dans la sporulation. Comme expliqué dans le chapitre II.5.1.1, l'enzyme E2 et la sous-unité E1 β du complexe pyruvate déshydrogénase y sont impliquées lorsque le pyruvate est épuisé (Gao *et al*, 2002). Cela indique que la quantité de pyruvate dans la cellule pourrait servir de "checkpoint" pour la progression de la sporulation après les étapes II et III.

Le pyruvate a également une influence dans la division cellulaire chez *B. subtilis*. En effet, la délétion de *pykA*, le gène codant pour la pyruvate kinase, entraîne une localisation aberrante, aux pôles de la cellule, de l'anneau Z (Monahan *et al*, 2014). Cet anneau Z permet de localiser le site de division cellulaire en constituant un échafaudage pour l'assemblage de l'appareil de division, et en générant une force de contraction sur la membrane cytoplasmique

au cours de la cytokinèse. Un positionnement polaire de cet anneau perturbe la répartition des éléments nécessaires au sein des cellules filles et entraîne la formation de minicellules (minicell). L'ajout de pyruvate dans le milieu de culture, permet de supprimer l'effet de la délétion de *pykA* sur la localisation de l'anneau Z (Monahan *et al*, 2014). Cette mauvaise localisation est également liée à l'enzyme PDH E1 α (la sous-unité α de la pyruvate déshydrogénase). En effet, la répartition de cette enzyme dans la cellule est dépendante du taux de pyruvate, et sa présence stimule la formation d'un anneau Z. Ainsi, en présence d'une forte concentration de pyruvate l'assemblage de protéines FtsZ, responsable de la formation de l'anneau Z, est stimulé par la présence de PDH E1 α au centre de la cellule au niveau du nucléoïde. Lorsque la synthèse de pyruvate est artificiellement bloquée par la délétion de *pykA*, son taux dans la cellule est plus faible entraînant une accumulation de PDH E1 α aux pôles et une localisation aberrante de l'anneau Z (Monahan *et al*, 2014) (**Figure 10**).

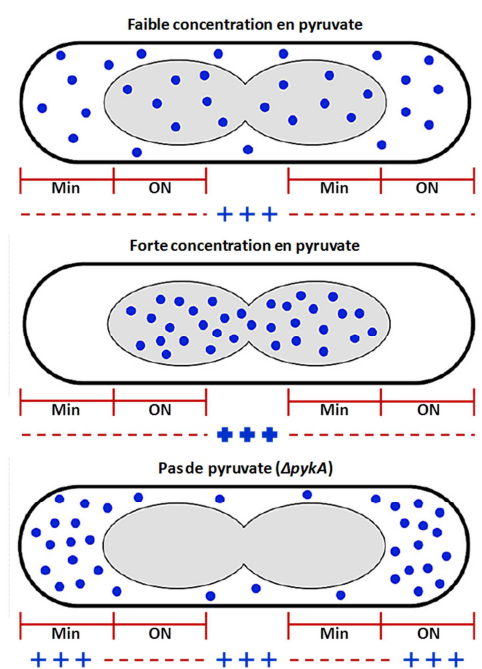


Figure 10 : Répartition de PDH E1 α et disposition des anneaux Z en fonction de la concentration en pyruvate de la cellule. Les points bleus représentent la disposition dans la cellule de PDH E1 α . La zone en gris représente le nucléoïde. En plus de PDH E1 α , deux mécanismes empêchent la formation d'anneaux Z : le système de régulation négatif Min et l'occlusion du nucléoïde (ON). L'effet du système Min peut être aboli par l'accumulation de PDH E1 α . La combinaison de tous ces facteurs détermine la localisation des anneaux Z (croix bleues). D'après Monahan *et al*, 2014

Chez *Caenorhabditis elegans*, l'augmentation de la quantité de pyruvate dans l'organisme prolonge sa longévité. Cet effet se produit au travers du complexe pyruvate déshydrogénase, dont l'activité est dépendante de la quantité de pyruvate disponible (Mouchiroud *et al*, 2011).

II.5.4 Rôle du pyruvate dans la virulence

La capacité à utiliser rapidement les nutriments présents dans le milieu est primordiale pour les bactéries pathogènes (Chang *et al*, 2004). Cela leur permet de se s'implanter au détriment des autres espèces présentes, en réduisant la disponibilité en nutriment. Cependant, l'accumulation d'intermédiaires phosphorylés inhibe la croissance et induit un stress pour la cellule (Vanderpool, 2007).

Lors d'une croissance en glucose, la bactérie pathogène *Yersinia pseudotuberculosis* excrète une grande quantité de pyruvate, ce qui lui permet de consommer très rapidement le sucre sans accumuler d'intermédiaires non désirés et d'avoir un impact positif sur sa virulence (Bücker *et al*, 2014). De plus, les régulateurs Crp (catabolite repression protein) et CsrA (carbon storage regulator A), connus pour leur rôle dans la régulation du métabolisme et de la virulence, ciblent particulièrement les enzymes impliquées dans le contrôle du nœud du pyruvate (Bücker *et al*, 2014). Cela indique que le pyruvate et son métabolisme sont importants pour le contrôle de la virulence chez *Yersinia pseudotuberculosis*.

Le champignon *Candida albicans* est un organisme commensal commun chez l'Homme. Chez des personnes fragilisées il peut attaquer l'organisme et devenir pathogène. Il a été montré qu'il était capable lors de ces infections de produire de grandes quantités de pyruvate. Celui-ci peut servir de précurseur pour la fabrication d'acétoacétate, connu pour inhiber la phagocytose par les neutrophiles. Ainsi, la forte production de pyruvate permettrait la fabrication d'acétoacétate, procurant une protection à *Candida albicans* contre les neutrophiles et favorisant ainsi sa virulence (Saeed, 2000).

II.5.5 Rôle du pyruvate dans certaines maladies chez l'Homme

Chez les eucaryotes la glycolyse s'effectue dans le cytosol tandis que le cycle de Krebs prend place dans la mitochondrie. Ainsi, le pyruvate produit dans le cytosol est transporté à travers la membrane mitochondriale pour rejoindre le cycle de Krebs. Le pyruvate est un métabolite clef dans la cellule et chez l'Homme la perturbation du pool de pyruvate est impliquée dans plusieurs maladies.

II.5.5.1 Les Maladies neurodégénératives

Un dysfonctionnement dans le métabolisme du pyruvate se retrouve dans plusieurs maladies neurodégénératives. Le pyruvate est notamment impliqué dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer en tant qu'acteur principal pour la production d'énergie des cellules neuronales. Ainsi, une augmentation du niveau de pyruvate dans le liquide cérébro-spinal est

un indicateur de la maladie d'Alzheimer, tandis qu'une augmentation dans le sérum sanguin est un indicateur de la maladie de Parkinson (Gray *et al*, 2013).

II.5.5.2 Diabète, obésité et arrêt cardiaque

Chez l'Homme, le pyruvate et le niveau d'ADP régulent l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase au travers de l'activité de la pyruvate déshydrogénase kinase (Roche & Hiromasa, 2007). Il a été montré que l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase avait un rôle majeur dans le diabète de type II, l'obésité et les arrêts cardiaques en perturbant le cycle normal de consommation du pyruvate, causant l'accumulation de sucres et/ou de lactate qui perturbe le fonctionnement classique de la cellule (Roche & Hiromasa, 2007; Gray *et al*, 2013).

II.5.5.3 Cancer

Dans un organisme multicellulaire, les cellules produisent de l'énergie essentiellement sous forme d'ATP pour maintenir le fonctionnement de leur machinerie. Cette production d'ATP se déroule principalement dans la mitochondrie en présence d'oxygène et permet de former trente-six molécules d'ATP pour une molécule de glucose consommée (Vander Heiden *et al*, 2009). Lors d'un cancer, les cellules ont des besoins différents et doivent produire les composés nécessaires à leur prolifération. Les cellules cancéreuses modifient alors leur métabolisme en redirigeant les métabolites glycolytiques vers les processus de biosynthèse plutôt que vers la phosphorylation oxydative et ce, même en présence d'oxygène. La disponibilité en nutriment n'étant pas un problème pour les cellules d'un organisme multicellulaire, l'énergie nécessaire pour la cellule est obtenue en augmentant l'incorporation du glucose ainsi que son utilisation lors de la glycolyse. L'ensemble de ces modifications métaboliques est appelé l'effet Warburg (ou glycolyse aérobie) (Ferguson & Rathmell, 2008; Vander Heiden *et al*, 2009; Gray *et al*, 2013). Le changement de flux métabolique se produisant lors de l'effet Warburg s'effectue au niveau du pyruvate qui va être majoritairement consommé dans le cytosol et donner du lactate (**Figure 11**). Et donc, pour la transition vers l'effet Warburg, la régulation des enzymes impliquées dans le devenir du pyruvate est totalement modifiée faisant de ce composé un élément central pour la prolifération de ces cellules cancéreuses (Gray *et al*, 2013).

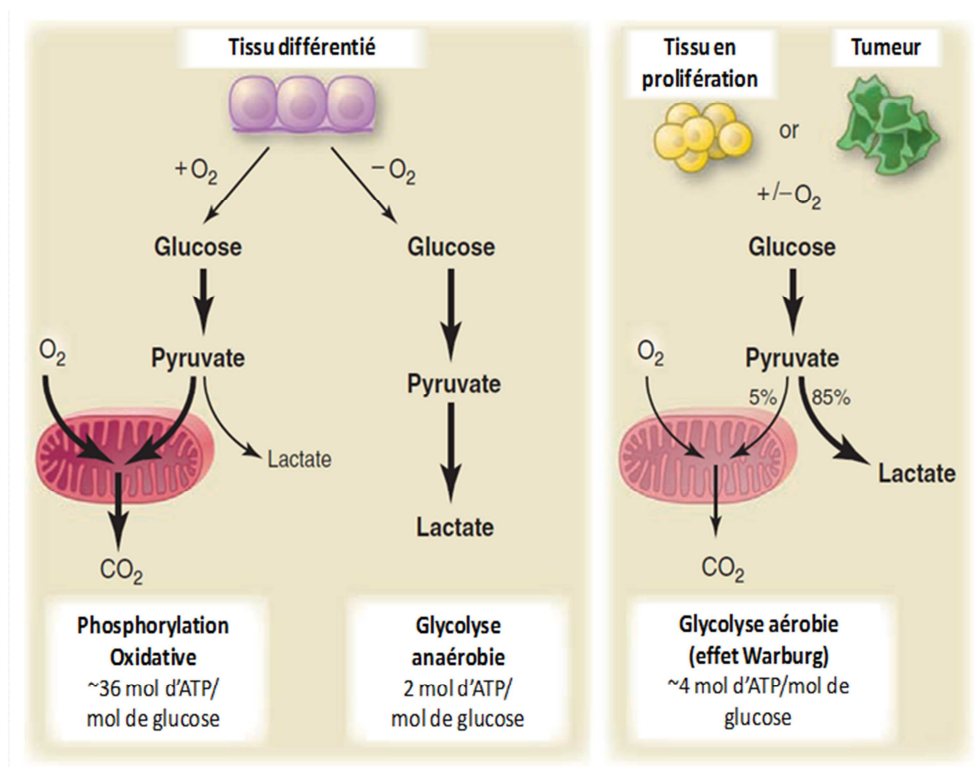


Figure 11 : Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (effet Warburg). Dans les tissus différenciés, la production est dirigée vers la fabrication d'énergie et donc vers la mitochondrie en présence d'oxygène, ou vers le lactate sans oxygène. Dans les tissus en prolifération ou les tumeurs, quelque soit le statut en oxygène, le flux est majoritairement dirigé vers le lactate. De plus, dans les cellules en prolifération $\sim 10\%$ du flux est dirigé vers les différentes voies de biosynthèses en amont du pyruvate. D'après Vander Heiden *et al*, 2009

III Régulation des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du carbone chez *Bacillus subtilis*

Le métabolisme central du carbone est le principal fournisseur d'énergie et de précurseurs pour la cellule. Sa régulation fine est donc primordiale pour assurer une bonne répartition des différents métabolites dans les différentes voies cataboliques et anaboliques. Elle s'exerce à la fois sur les transporteurs des sources de carbone et les enzymes directement impliquées dans le métabolisme. Elle s'applique aussi bien à l'expression des gènes codant ces protéines qu'à la régulation de leur activité, conduisant à l'utilisation préférentielle des sources de carbone les plus appropriées pour la croissance. Cette régulation appelée « répression catabolique » (ou CCR pour Carbon Catabolite Repression) établit une hiérarchie dans l'utilisation des sources de carbone où le plus souvent le glucose se trouve au sommet.

Bien que les mécanismes de la CCR diffèrent entre les bactéries à Gram négatif et positif, pour les deux groupes, le PTS joue un rôle important dans cette régulation (Deutscher *et al*, 2006; Deutscher, 2008; Görke & Stülke, 2008). Le mécanisme le plus répandu pour exercer cette régulation implique chez les bactéries à Gram positif le régulateur global CcpA (pour Catabolite Control Protein A). Entre 5 et 10% du génome bactérien peut être régulé par ce mécanisme (Moreno *et al*, 2001; Blencke *et al*, 2003; Görke & Stülke, 2008). En présence d'une source préférentielle de carbone les gènes impliqués dans l'utilisation des sources secondaires sont réprimés.

En plus de la régulation exercée par la répression catabolique, l'expression des gènes codant pour les transporteurs est le plus souvent inductible par la source de carbone qu'ils transportent (Asai *et al*, 2000; Yamamoto *et al*, 2000; Doan *et al*, 2003; Tanaka *et al*, 2003). Cela crée un niveau de régulation supplémentaire évitant de gaspiller des ressources en produisant des transporteurs inutiles.

Selon les sources de carbone utilisées par la cellule le flux métabolique peut être modifié. Par exemple lors d'un passage d'une croissance avec une source de carbone glycolytique vers une croissance avec une source gluconéogénique, le flux va être modifié pour permettre de parcourir la voie de la glycolyse du cycle de Krebs vers la voie des pentoses phosphates. De tels changements entraînent une modification de l'expression de certaines enzymes régulées par des facteurs de transcription moins pléiotropes que CcpA (Aymerich *et al*, 2007).

Chez les bactéries, la régulation de l'expression des gènes se situe le plus souvent au niveau du contrôle de leur transcription. De ce fait, l'organisation en opéron qui est

caractéristique des procaryotes, permet de réguler plusieurs gènes impliqués dans un même phénomène de façon concomitante.

III.1 Activation de l'expression des transporteurs par les systèmes à deux composants

Chez *B. subtilis* il existe au moins trente-quatre systèmes à deux composants (Fabret *et al*, 1999), impliqués notamment dans la régulation du métabolisme central du carbone et plus particulièrement de l'entrée des sources gluconéogéniques. En effet, tous les transporteurs de sources de carbone gluconéogéniques étudiés ont montré que l'expression de leur gène était soumise à une induction par un système à deux composants (Asai *et al*, 2000; Yamamoto *et al*, 2000; Doan *et al*, 2003). Ceux-ci jouent donc un rôle important dans la régulation du métabolisme du carbone.

III.1.1 Description générale

Les systèmes à deux composants (SDC) ont d'abord été identifiés chez les bactéries (Stock *et al*, 2000; Gao & Stock, 2009). Ils ont ensuite été mis en évidence chez les archées et les eucaryotes. Ce sont des mécanismes de transduction d'un signal qui lient la présence d'un stimulus environnemental à une réponse adaptée de la cellule à celui-ci. On les retrouve dans des processus très variés comme la virulence, la motilité, la croissance et le métabolisme. Depuis leur découverte il y a plus de vingt ans, ces mécanismes ont été très largement étudiés et sont très bien connus. Les SDCs sont énormément utilisés chez les bactéries et certaines peuvent en contenir près de deux cents (Laub & Goulian, 2007). La forme canonique d'un SDC se compose d'une histidine kinase et d'une protéine régulatrice. L'histidine kinase est un senseur qui reconnaît un stimulus conduisant à son autophosphorylation aux dépens de l'ATP sur un résidu histidine puis transfère ce phosphate sur un résidu aspartique de sa protéine régulatrice associée, entraînant son activation par modification conformationnelle. En absence de stimulus, l'histidine kinase a un rôle de phosphatase, et déphosphoryle sa protéine régulatrice pour empêcher une réponse non désirée (Gao & Stock, 2009; Podgornaia & Laub, 2013) (**Figure 12**).

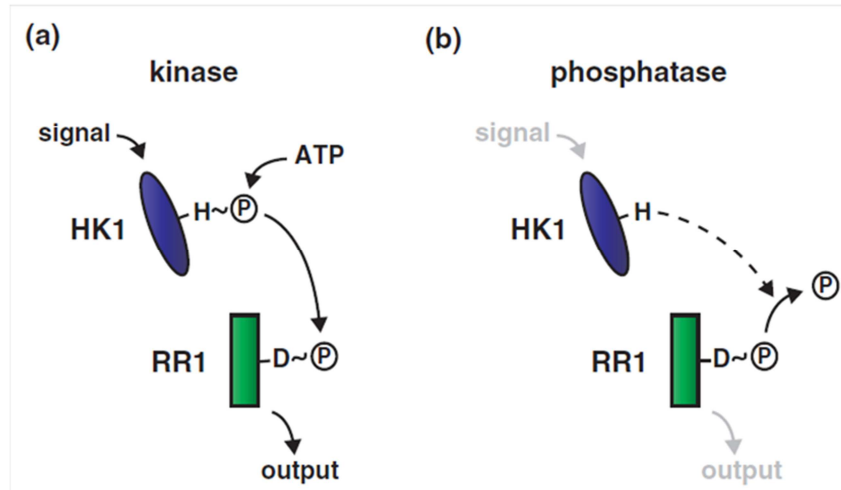


Figure 12 : Représentation de la forme canonique d'un système à deux composants. Avec l'activité kinase inductrice du mécanisme qui va permettre d'induire une réponse (a), et l'activité phosphatase qui va empêcher une réponse non désirée (b). HK1 représente l'histidine kinase et RR1 la protéine régulatrice. D'après Podgornaia & Laub, 2013

Très souvent des protéines auxiliaires sont également associées à ce mécanisme pour réguler l'activité de l'histidine kinase ou la stabilité de la protéine régulatrice. La voie de transfert du groupement phosphate peut également être étendue à un "phosphorelay" où l'histidine kinase est modifiée. Elle s'autophosphoryle puis s'autotransfère le groupement phosphate sur un de ses domaines, similaire à un domaine phosphorécepteur de protéine régulatrice. Le groupement phosphate est alors transféré vers une histidine phosphotransférase puis finalement sur sa protéine régulatrice (Laub & Goulian, 2007; Gao & Stock, 2009) (**Figure 13**).

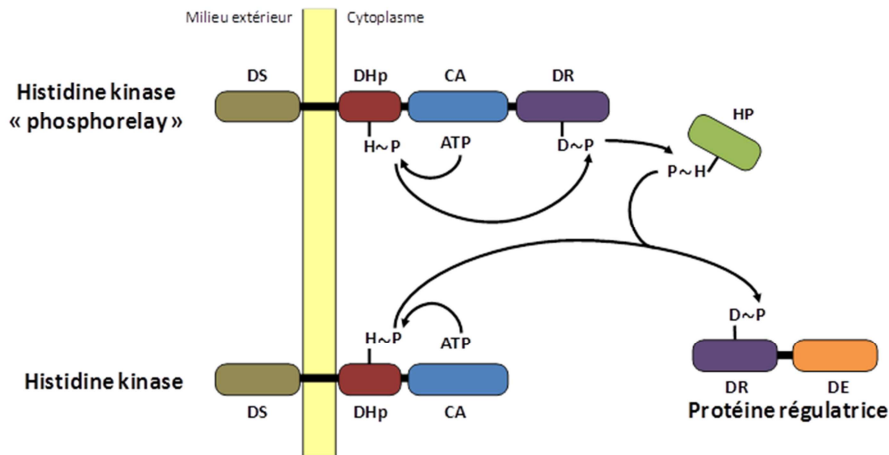


Figure 13 : Schéma d'une histidine kinase et d'un "phosphorelay". Avec DS un domaine senseur, DHp un domaine histidine phosphotransférase, CA un domaine catalytique et ATPase, DR un domaine récepteur, HP une histidine phosphotransférase et DE un domaine effecteur. Avec H une histidine et D un aspartate. Le domaine histidine phosphotransférase s'autophosphoryle au dépend de l'ATP, puis transfère le phosphate sur le domaine récepteur de la protéine régulatrice. Dans le cas d'un phosphorelay, l'histidine kinase possède un domaine récepteur sur lequel le phosphate est transféré après l'autophosphorylation, puis sur l'histidine phosphotransférase. Enfin, le phosphate est transféré sur la protéine régulatrice. Adapté de Laub et Goulian 2007

Malgré la très grande conservation des différents domaines des SDCs, la cellule est capable de maintenir la spécificité de chacun. Il est cependant possible d'avoir des régulations plus complexes, où l'on peut distinguer trois groupes (Laub & Goulian, 2007) (**Figure 14**) :

- Les régulations croisées, où une histidine kinase associée à une protéine régulatrice peut dans certaines circonstances interagir avec une protéine régulatrice d'un autre SDC.
- Les régulations "one-to-many", où une histidine kinase est associée à plusieurs protéines régulatrices
- Les régulations "many-to-one", où plusieurs histidines kinases sont associées à une seule protéine régulatrice.

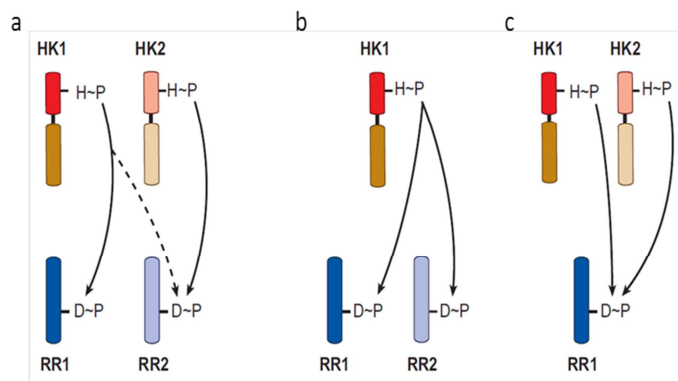


Figure 14 : Schéma des différentes possibilités de régulation croisée des systèmes à deux composants. Une histidine kinase (HK1 ou HK2) est capable dans certain cas d'agir sur une protéine régulatrice (RR1 ou RR2) qui possède sa propre histidine kinase(a). Une histidine kinase peut également avoir plusieurs protéines régulatrices (b) ou plusieurs histidines kinases peuvent avoir la même cible (c). D'après Laub & Goulian, 2007

Dans la majorité des cas, les régulations croisées doivent être réduites à un minimum pour conserver la spécificité de la réponse à un stimulus. Ainsi, l'activité phosphatase d'une histidine kinase peut garantir cette spécificité. Dans certaines circonstances, il peut être avantageux d'avoir une régulation croisée. Cela permet d'intégrer plusieurs signaux pour une même réponse ou, au contraire, permet de diversifier les réponses à un même stimulus. Cette régulation est distincte des régulations one-to-many et many-to-one. En effet, la régulation one-to-many nécessite forcément plusieurs protéines régulatrices pour induire une réponse complète au stimulus, et la régulation many-to-one nécessite plusieurs histidines kinases (Laub & Goulian, 2007).

III.1.2 Partenaires des systèmes à deux composants

III.1.2.1 Les histidines kinases

Les histidines kinases sont capables de s'autophosphoryler à partir d'une molécule d'ATP sur un résidu histidine se trouvant dans leur domaine catalytique (**Figure 13**). Cette phosphorylation est relativement instable, ce qui favorise le transfert du phosphate vers la protéine régulatrice. De très nombreuses histidines kinases possèdent une activité phosphatase liée également au résidu histidine. Cependant, certains mutants ne possédant pas ce résidu maintiennent leur activité phosphatase, indiquant l'existence de multiples mécanismes de déphosphorylation (Gao & Stock, 2009).

On distingue trois groupes d'histidines kinases selon la localisation de leur domaine sensor. Le premier regroupe, les histidines kinases de forme canonique, qui forment un homodimère presque entièrement membranaire, avec une boucle extracellulaire contenant un

domaine senseur, et un domaine transmetteur se trouvant dans le cytoplasme à la suite du dernier segment transmembranaire (Cheung & Hendrickson, 2010). Le deuxième comprend des enzymes contenant de multiples domaines transmembranaires, mais pas de domaine extracellulaire apparent. Dans ce cas, le domaine senseur est supposé être inclus dans les segments transmembranaires (Cheung & Hendrickson, 2010). Enfin, un groupe contient les protéines dont le domaine senseur est cytoplasmique détectant des stimuli intracellulaires.

III.1.2.2 Les protéines régulatrices

Les protéines régulatrices des différents SDCs possèdent un phosphorécepteur commun, mais ont des domaines effecteurs différents. La forme active de ce phosphorécepteur présente une conformation assez similaire à celle de la forme inactive. La différence primordiale, est que sous sa forme active, des résidus Ser/Thr et Phe/Tyr, sont repositionnés pour pouvoir agir avec le domaine effecteur et induire l'effet régulateur de celui-ci (Gao & Stock, 2009). Les domaines effecteurs peuvent être classés en cinq familles. Ceux ne contenant qu'un domaine phosphorécepteur, ceux avec une activité enzymatique, et ceux se liant à d'autres protéines, à l'ARN ou à l'ADN. Cette dernière famille représente la plus grande majorité des domaines effecteurs (

Figure 15). Chaque famille peut être partagée en sous familles structurales dont le nom correspond au membre le mieux caractérisé de cette sous famille (Gao & Stock, 2009).

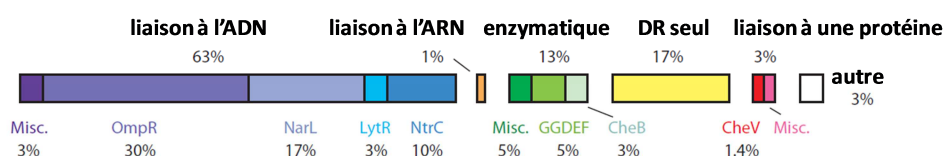


Figure 15 : Répartition des domaines régulateurs des protéines régulatrices des systèmes à deux composants. Les familles sont regroupées selon leur fonction et leur nom correspond à la protéine la mieux décrite de cette famille. Avec DR : domaine récepteur. En violet et bleu les sous-familles se liant à l'ADN, en orange à l'ARN, en rouge et rose à une protéine. Les couleurs vertes représentent les sous-familles avec une activité enzymatique et en jaune les protéines régulatrices ne possédant qu'un domaine récepteur. D'après Gao & Stock, 2009

III.2 La répression catabolique dépendante de CcpA

Chez les bactéries à Gram positif et à faible pourcentage en GC et plus particulièrement chez *B. subtilis*, la répression catabolique est principalement exercée par le régulateur global CcpA appartenant à la famille des répresseurs LacI/GalR. Cette régulation est associée au PTS (cf chapitre I.2.1) au travers de la protéine HPr. En effet, pour se lier de façon efficace à l'ADN CcpA forme un complexe avec HPr. La formation de ce complexe nécessite que HPr

soit phosphorylé sur son résidu sérine situé en position 46 (Henkin *et al*, 1991; Deutscher *et al*, 1994, 1995). Cette phosphorylation est catalysée par la kinase/phosphatase HPrK/P ATP-dépendante, dont l'activité est liée à l'état physiologique de la cellule. Cet état est indiqué par la quantité de FBP et de glucose-6-phosphate (Gösseringer *et al*, 1997; Titgemeyer & Hillen, 2002). Inversement, en présence d'une forte concentration en phosphate inorganique (Pi) HPrK/P a une activité phosphatase qui déphosphoryle HPr (Deutscher *et al*, 2006). La balance entre l'activité kinase et phosphatase est donc régulée allostériquement en fonction de l'état de la cellule. L'accumulation de FBP et ATP est caractéristique d'une activité glycolytique élevée en présence de sucres rapidement métabolisables. En revanche l'absence de sources de carbone rapidement métabolisables favorise l'accumulation de Pi.

L'enzyme HPr peut être phosphorylé sur deux résidus, l'histidine 15 ou la sérine 46. La phosphorylation par EI de HPr sur le résidu histidine 15, situé en surface sur la partie N-terminale, permet le transfert du phosphate vers l'enzyme EII et entraîne l'entrée et la phosphorylation concomitante d'un sucre. La phosphorylation de HPr sur la sérine 46 entraîne un changement de structure qui provoque également une répulsion électrostatique entre le groupement phosphate en ser46 et le résidu acide glutamique en position 84 de EI. Ces deux changements vont fortement défavoriser la phosphorylation en his15 de HPr par EI limitant le nombre de HPr doublement phosphorylé (Garrett *et al*, 1999; Deutscher *et al*, 2006). Une fois HPr-ser46-P (HPr phosphorylé sur la sérine 46) associé à CcpA, le complexe formé peut se lier aux séquences spécifiques de l'ADN que sont les boîtes *cre* (**Figure 16**).

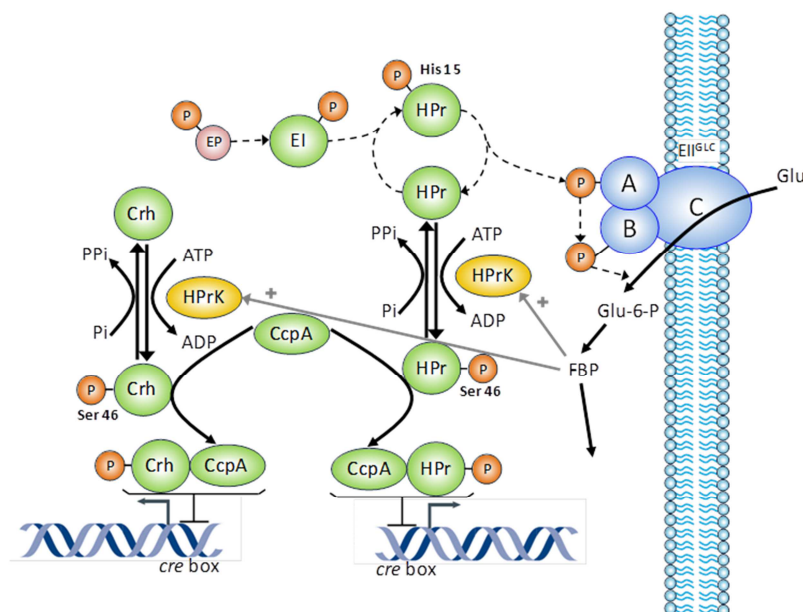


Figure 16 : Schéma de la répression catabolique lié au PTS chez *Bacillus subtilis*. Avec P-EP représentant le PEP, EI l'enzyme I, A l'enzyme IIA, B l'enzyme IIB, C l'enzyme IIC, Glu le glucose, Glu-6-P le glucose-6-phosphate et FBP le fructose-1,6-bisphosphate. Le transfert de phosphate est représenté par des flèches pointillées. La flèche grise représente l'effet positif de la concentration de FBP sur l'activité de HPrK. CcpA se lie à HPr-ser46-P ou Crh-ser-46-P pour former un complexe actif qui va se lier au site *cre*. Adapté de Görke et Stülke, 2008

Les boîtes *cre* sont des pseudo-palindromes fortement dégénérés dont la séquence consensus est WWWTGNWARCGNTTWC (où W peut être un A ou T, R un A ou G et N toutes les bases), où les résidus très bien conservés sont soulignés (Miwa *et al*, 2000; Schumacher *et al*, 2010; Marciniak *et al*, 2012; Buescher *et al*, 2012). Le complexe CcpA/HPr-ser46-P est capable de se lier à des séquences d'ADN très différentes. Cela est dû à une forte flexibilité et à la présence de nombreux résidus non-polaires dans la région qui se lie à l'ADN, ce qui permet d'avoir une bonne affinité sans avoir de liaison rigide (Schumacher *et al*, 2010). En fonction de la séquence des sites *cre*, on peut les séparer en deux catégories : les sites à forte affinité et les sites à faible affinité. Bien que la différence entre les deux catégories ne soit pas très prononcée, on constate que les résidus en position cinq, huit, dix, onze, treize, quatorze et seize sont mieux conservés pour les sites à forte affinité par rapport aux sites à faible affinité (Marciniak *et al*, 2012). Jusqu'à maintenant plus de soixante-dix boîtes *cre* ont été identifiées chez *B. subtilis* montrant une différence de régulation en fonction du niveau de protéine CcpA disponible dans la cellule (Fujita, 2009; Marciniak *et al*, 2012).

Il existe aussi chez *B. subtilis* une protéine très homologue à HPr nommée Crh, phosphorylable sur sa sérine 46 et pouvant former avec CcpA un complexe capable de se lier aux sites *cre* et d'induire la répression catabolique (**Figure 16**). Cependant la structure du complexe CcpA/HPr-ser46-P/*cre* est significativement différente de la structure du complexe

CcpA/Crh-ser46-P/*cre*, ce qui peut partiellement expliquer les différences d'ancrage aux sites *cre* entre les deux complexes (Deutscher, 2008; Schumacher *et al*, 2010). De plus, l'expression de Crh est plus faible que celle de HPr, Crh-ser46-P a une affinité plus faible avec CcpA que HPr-ser46-P (Görke *et al*, 2004; Seidel *et al*, 2005; Schumacher *et al*, 2006; Görke & Stülke, 2008).

La régulation par le complexe CcpA permet également d'établir une hiérarchie dans l'utilisation des sources de carbone. L'effet de répression catabolique a été le plus souvent étudié en présence de glucose, mais existe également pour les autres sources de carbone. Ainsi la régulation varie selon différents carbohydrates, avec le glucose au sommet d'une hiérarchie dépendant de l'état de phosphorylation de HPr sur son résidu sérine 46 (Singh *et al*, 2008). Plus la forme HPr-ser46-P est présente dans la cellule, plus la répression exercée est forte. De plus, la phosphorylation sur l'histidine 15 ne semble pas avoir d'impact direct sur la répression par le complexe CcpA (Singh *et al*, 2008). Le niveau de répression est directement lié à l'activité de HPrK/P qui catalyse la phosphorylation de HPr sur la sérine 46. Comme FBP est clairement connu pour être un activateur de l'activité kinase de HPrK/P, il est probable que le niveau de FBP soit corrélé avec l'activité de HPrK/P. Bien que le taux de FBP soit élevé pour toutes les sources de carbone ayant un effet répresseur, ce taux n'est pas toujours corrélé avec la force de la répression. Cela indique que le taux de FBP n'est pas le seul facteur permettant d'agir sur l'activité kinase de HPrK/P et d'établir cette hiérarchie (Singh *et al*, 2008). Ainsi, le niveau d'ATP et d'autres métabolites (Ramström *et al*, 2003) doivent également avoir un rôle sur cette activité.

III.2.1 La répression catabolique par le glucose

Chez de nombreuses bactéries, le glucose permet une croissance forte et réprime l'utilisation des sources alternatives de carbone. Comme une très grande partie des études sur la répression catabolique ont été faites en présence de glucose, lorsque l'on parle de la répression catabolique, on parle bien souvent de celle exercée par le glucose (Görke & Stülke, 2008). Le mécanisme décrit pour le fonctionnement de la répression catabolique par CcpA est donc basé sur la régulation par le glucose. Chez *B. subtilis*, le glucose est transporté par un PTS et est rapidement métabolisé, permettant d'obtenir rapidement des taux de FBP et d'ATP importants, et donc d'activer l'activité kinase de HPrK/P, entraînant la phosphorylation de HPr sur la sérine 46.

D'autres sources de carbone sont rapidement métabolisables au même titre que le glucose, notamment les autres sucres transportés par un PTS et sont capables d'induire la répression catabolique *via* CcpA, mais sont également sujet à cette répression. La présence du glucose au sommet de la hiérarchie d'utilisation des sources de carbone s'explique par le fait qu'aucun site *cre* proche du gène *ptsG* codant pour le transporteur principal du glucose n'a pu être détecté, contrairement aux autres transporteurs (Fujita, 2009; Marciniak *et al*, 2012). Elle peut également être en partie due à la faible quantité de HPr-his15-P détectée lors d'une croissance en présence de glucose. En effet, les enzymes EIIs spécifiques à chaque PTS entrent en compétition vis-à-vis de HPr-his15-P, leur donneur de phosphate commun (cf chapitre I.2.1). Ainsi, dans le mutant *ptsHI*, où la sérine 46 est remplacée par une alanine et ne permet plus la phosphorylation à cette position, la quantité de HPr-his15-P est augmentée et donc la compétition pour cette dernière est plus faible. Dans ces conditions, en présence de glucose et de mannitol (molécule transportée dans la cellule par un système PTS) il a été montré que l'entrée du mannitol était deux fois plus élevée (Deutscher *et al*, 1994; Jing Jing Ye & Saier, 1996).

III.2.2 La répression catabolique par le malate

Alors que les acides organiques sont généralement considérés comme se trouvant en bas de la hiérarchie d'utilisation des sources de carbone, le malate semble faire exception chez *B. subtilis*. En effet, il est rapidement métabolisé par la cellule, entraîne un taux de croissance similaire à celui du glucose, peut être co-métabolisé avec ce dernier, et est également capable de réprimer l'entrée de sources secondaire de carbone (Asai *et al*, 2000; Doan *et al*, 2003; Kleijn *et al*, 2010; Meyer *et al*, 2011b). Il a été montré que la répression catabolique exercée par le malate sur les sources de carbone glycolytiques passait par CcpA et HPr-ser46-P. Comme expliqué ci-dessus, cette phosphorylation de HPr est dépendante de l'activité de HPrK/P et donc de la quantité de FBP et d'ATP dans la cellule. Il a été montré que lors d'une croissance sur malate comme seule source de carbone, la concentration en FBP et ATP est suffisante pour induire la répression catabolique par CcpA (Meyer *et al*, 2011b). Cependant, le niveau de répression exercé sur l'entrée d'une source de carbone peut être très différent selon que cette répression a lieu en présence de malate ou en présence de glucose (Kleijn *et al*, 2010).

Pour ces raisons nous nous sommes intéressés au mécanisme de régulation de l'entrée des sources de carbone glycolytique par le malate. Cette étude sera traitée dans la deuxième partie de cette thèse.

III.2.3 Activation catabolique par CcpA : « l'overflow »

CcpA est également impliquée dans l'activation de certains gènes. Ce mécanisme est appelé l'activation catabolique (CCA pour Carbon Catabolite Activation). Pour cette régulation le site *cre* se trouve généralement en amont du promoteur du gène cible (Fujita, 2009; Marciniak *et al*, 2012). La plupart des gènes affectés par la CCA chez *B. subtilis* sont impliqués dans la voie de l'overflow. Ainsi, le gène *pta* codant pour la phosphotransacétylase et le gène *ackA* codant pour l'acétate kinase, sont positivement régulés par CcpA (Turinsky *et al*, 1998; Presecan-Siedel *et al*, 1999). Il semble également que CcpA soit impliquée dans l'activation de l'expression de *lctE* (*ldh*), le gène codant pour la lactate déshydrogénase, en effet un site *cre* a été trouvé en amont du promoteur de ce gène (Lorca *et al*, 2005; Aymerich *et al*, 2007). Enfin, le gène *ilvB* impliqué dans la biosynthèse des acides aminés branchés, est lui aussi sujet à la CCA (Tojo *et al*, 2005; Shivers & Sonenshein, 2005).

III.3 Répression catabolique autre que CcpA

III.3.1 Régulation par CodY, CcpB et CcpC

CodY est un régulateur transcriptionnel sous forme dimérique, très conservé chez les bactéries à Gram-positif à faible GC% comme *B. subtilis*. Il est impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes lors de la phase stationnaire et dans l'initiation de la sporulation. Cette protéine est capable de lier le GTP et de l'utiliser comme marqueur de l'état énergétique de la cellule. (Sonenshein, 2005; Aymerich *et al*, 2007; Fujita, 2009). Le GTP permet ainsi d'activer la fonction de répression de CodY. Cette fonction est également activée par les acides aminés branchés (AAB), et plus particulièrement l'isoleucine, dont les concentrations peuvent également être un indicateur de l'état physiologique de la cellule. Ces deux corépresseurs fonctionnent de façons indépendantes et additives (Sonenshein, 2005).

CodY a tout d'abord été identifié comme répresseur de l'opéron *dppABCDE* (Slack *et al*, 1993, 1995). Il a par la suite été montré que CodY pouvait également avoir un rôle d'activateur et participait à la régulation de plus de cent gènes souvent impliqués dans l'adaptation de la bactérie à des conditions de croissance faible (Sonenshein, 2005).

CodY possède plusieurs cibles parmi les gènes impliqués dans le métabolisme du carbone. Au sein du cycle de Krebs le gène *citB*, en plus de sa régulation par CcpA, est négativement contrôlé par CodY qui peut se fixer au niveau du promoteur du gène en compétition avec le régulateur CcpC, lors d'une croissance sur un milieu riche (concentration en GTP et AAB élevée) (Aymerich *et al*, 2007). Comme pour CcpA, CodY est également impliqué dans la régulation de l'overflow en activant l'expression du gène *ackA*. Dans ce cas, l'activation de CodY est plus dépendante des AAB que du GTP (Shivers *et al*, 2006). De plus, CodY semble également impliquée dans la régulation de *lctE* (Aymerich *et al*, 2007).

Ainsi CcpA et CodY dirigent le flux du métabolisme du carbone en fonction de l'état de la cellule lors de différentes conditions de croissance. Lorsqu'ils sont tous les deux inactifs (ce qui se produit lors d'une croissance dans un milieu minimum avec une source de carbone peu favorable pour la cellule) le flux arrivant au niveau du nœud anaplérotique est dirigé vers le cycle de Krebs pour produire du pouvoir réducteur et de l'ATP. Lorsque CcpA est actif mais pas CodY (par exemple dans un milieu minimum contenant du glucose et du glutamate), le cycle de Krebs va être réprimé par CcpA et CcpC et le flux sera dirigé vers la biosynthèse des AAB. Lorsque les deux sont actifs (dans un milieu riche), la glycolyse fournit suffisamment d'énergie et les principaux intermédiaires métaboliques, grâce à une consommation rapide des sources de carbone. Le cycle de Krebs n'est alors utile que pour produire les précurseurs qu'il est le seul à pouvoir fournir, et donc, la majorité du flux est redirigé vers la voie de l'overflow. L'acétate, l'acétoïne et lactate ainsi formés vont pouvoir être libérés dans le milieu et réutilisés après l'épuisement de la source de carbone.

CcpB (pour Catabolite control protein B) est une protéine qui présente trente pourcent de similarité de séquence avec CcpA et qui fait comme CcpA partie de la famille des répresseurs LacI/GalR (Chauvaux *et al*, 1998; Deutscher *et al*, 2006). Elle est impliquée dans la répression catabolique de certains opérons comme *gnt*, impliqué dans le métabolisme du gluconate, et l'opéron *xyl*, impliqué dans le métabolisme du xylose lors d'une croissance sur milieu solide (Chauvaux *et al*, 1998). En effet dans ces conditions, la répression catabolique est partiellement levée sur ces gènes lorsque CcpB est inactivée. Cependant, cet effet ne se retrouve pas lors d'une culture en milieu liquide avec une forte agitation, et il est partiel avec une agitation faible. Cela laisse supposer que l'activité de CcpB est influencée par des changements environnementaux tels que la densité cellulaire et la quantité d'oxygène disponible (Deutscher *et al*, 2006). De plus CcpB ne possède pas la séquence d'acides aminés

nécessaire pour la liaison avec HPr-ser46-P, et donc ne l'utilise pas comme cofacteur (Chauvaux *et al*, 1998; Deutscher, 2008).

CcpC (pour Catabolite control protein C) est un régulateur transcriptionnel spécifique, et régule l'expression des gènes *citB*, *citZ* et *citC* (Fujita, 2009; Mittal *et al*, 2013). Il fait partie des régulateurs de transcription de la famille LysR. Son expression est régulée par CcpA et par lui-même. Son activité est régulée par la concentration en citrate de la cellule (Fujita, 2009). Bien que CcpC n'ait qu'un rôle de répresseur au niveau de l'opéron *citZCH*, il a été montré que pour *citB* il pouvait également avoir un rôle activateur (Mittal *et al*, 2013). En effet, lorsque la concentration en citrate est faible, CcpC a un rôle de répresseur, et lorsque le taux de citrate est très élevé il va avoir un rôle d'activateur. Un modèle propose, qu'en présence d'une faible concentration de citrate, CcpC se lie à ses deux sites de fixation situés aux positions -66 et -27 en amont du gène *citB*, et ainsi bloquer l'accès de l'ARN polymérase à la zone promotrice. En présence d'une forte concentration de citrate intracellulaire, CcpC change de conformation et libère le site de fixation en -27, permettant la fixation de l'ARN polymérase. De plus CcpC reste lié au site de fixation en -66, ce qui permettrait une interaction avec l'ARN polymérase et augmenterait l'expression de *citB* (Mittal *et al*, 2013).

D'un point de vue physiologique, les différents rôles dans la régulation de CcpC, complétés par la régulation par CodY et CcpA entraînent un contrôle très fin de la mise en route du cycle de Krebs. Cela permet, lors d'une croissance sur une source de carbone rapidement métabolisable, de n'utiliser que très faiblement le cycle de Krebs et de rejeter, sous forme d'acétate et d'acétoïne, le surplus qui pourra être reconsommé plus tard. Cela représente un avantage compétitif pour la bactérie. Lorsque les conditions de croissance sont plus pauvres, *B. subtilis* va pouvoir utiliser le cycle de Krebs de façon fine pour maximiser l'utilisation de ses ressources (**Figure 17**).

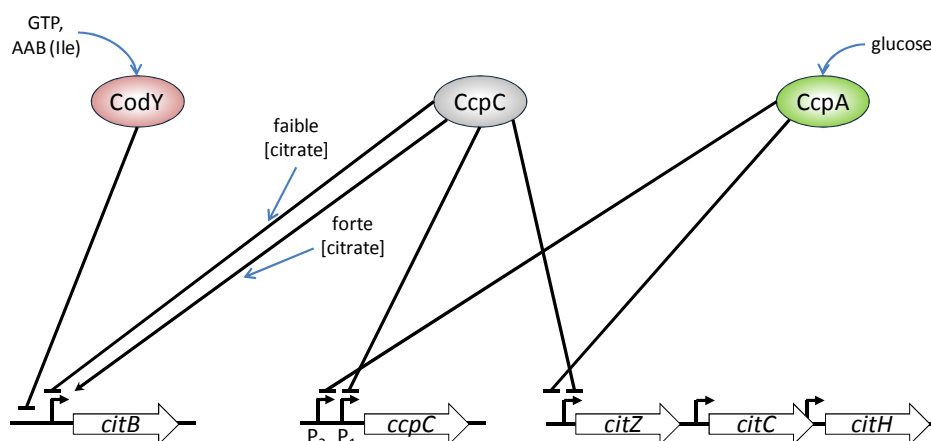


Figure 17 : Représentation schématique de la régulation des gènes des premières étapes du cycle de Krebs. L'activité de CodY est dépendante de la quantité de GTP et d'acide aminé branché (AAB) et notamment l'isoleucine (flèche bleue), celle de CcpA dépend de la présence de source de carbone comme le glucose et celle de CcpC dépend de la concentration en citrate ([citrate]) pour la régulation de *citB*. La flèche noire indique une induction par CcpC, les traits finis par une barre indiquent une répression. P1 et P2 représentent les deux promoteurs de *CcpC*.

III.3.2 Régulation des voies glycolytique et gluconéogénique par CggR et CcpN

III.3.2.1 Régulation de la voie glycolytique par CggR

CggR (pour central glycolytic genes regulator) est un régulateur transcriptionnel qui régule l'expression de l'opéron *gapA*, constitué des six gènes de la seconde partie de la glycolyse *cggR*, *gapA*, *pgK*, *tpi*, *pgm* et *eno* (Doan & Aymerich, 2003; Aymerich *et al*, 2007). Cet opéron possède une architecture complexe. Un promoteur situé en amont de *cggR* permet la production d'un transcrit englobant les six gènes. Il existe cependant un terminateur interne situé juste en aval de *gapA* et conduisant à un transcrit ne contenant que *cggR* et *gapA*. Il existe également dans la région intergénique entre *gapA* et *pgK* un promoteur interne qui permet la transcription des quatre derniers gènes de l'opéron (Ludwig *et al*, 2001; Doan & Aymerich, 2003). Parmi les gènes de l'opéron *gapA*, seul *gapA* est spécifique à la voie de la glycolyse les autres étant des enzymes également impliquées dans la voie de la gluconéogenèse. Le découplage partiel de l'expression de *cggR* et *gapA* de celle du reste de l'opéron permet à *pgK*, *tpi*, *pgm* et *eno* de s'exprimer même dans les conditions de répression par CggR. En effet, le site de fixation de CggR se trouve en aval du premier promoteur de l'opéron (position +32 à +67 par rapport au site de démarrage de la transcription) (Doan & Aymerich, 2003). CggR va donc pouvoir réprimer l'expression de l'opéron *gapA* avec un rôle de barrage et empêcher la formation d'un transcrit complet. La présence du promoteur interne permet néanmoins l'expression des quatre derniers gènes. La quantité de FBP dans la cellule a aussi un rôle d'effecteur négatif sur l'activité de CggR (**Figure 18**). Le site de fixation de CggR est composé de deux longues séquences répétées sur lesquelles deux dimères de CggR

peuvent se fixer (Zorrilla *et al*, 2007). En absence de FBP, les deux dimères forment un tétramère qui seul à la capacité de bloquer l'ARN polymérase (Doan & Aymerich, 2003). En présence d'une grande quantité de FBP les deux dimères sont indépendants. Donc, au passage de l'ARN polymérase chaque dimère de CggR serait décroché et permettrait d'obtenir un transcrit complet.

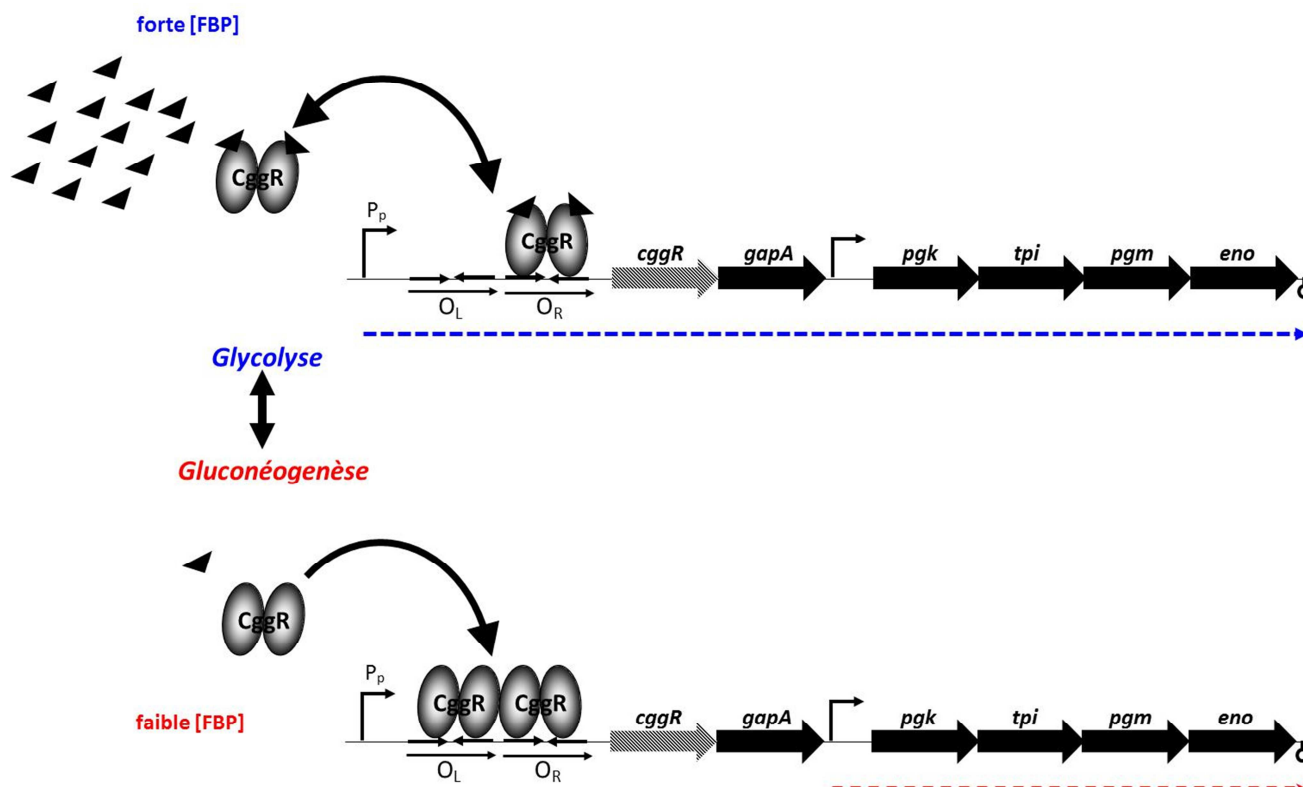


Figure 18 : Régulation de l'opéron *gapA* par CggR. Cette régulation est dépendante de la quantité de fructose-1,6-bisphosphate (FBP, triangle noir) dans la cellule, et ne s'exerce que lors de la néoglucogénèse. En présence d'une forte concentration de FBP, celui-ci se fixe à CggR et forme des dimères qui ne permettent pas la répression de *cggR* et *gapA*. L'intégralité de l'opéron est alors exprimé (flèche pointillée bleue). En faible concentration de FBP, CggR forme un tétramère et ne permet l'expression que des 4 derniers gènes de l'opéron (flèche pointillée rouge). D'après Aymerich et al, 2007

Ainsi CggR réprime l'expression de *gapA* et donc restreint la voie de la glycolyse. La présence de FBP, dont l'accumulation sert d'indicateur d'une croissance sur une source de carbone glycolytique, va permettre de lever cette répression et d'avoir une voie de la glycolyse totalement active.

III.3.2.2 Régulation de la voie gluconéogénique par CcpN

CcpN (pour Control catabolite protein of gluconeogenic genes) est un régulateur transcriptionnel spécifique, réprimant deux gènes essentiels à la voie de la gluconéogenèse que sont *pckA* et *gapB*, ainsi que *sr1*, un petit ARN régulateur impliqué dans le métabolisme de l'arginine (Servant *et al*, 2005; Licht *et al*, 2005). Cet ARN peut également être traduit en

un peptide qui stabilise l'ARNm de *gapA* (Gimpel *et al*, 2010). CcpN a aussi un rôle de régulateur positif comme pour le gène *thyB* de la thymidylate synthase (Eckart *et al*, 2009). CcpN régule l'expression de ces gènes en présence d'une forte concentration d'ATP et à un pH faible, indicateurs d'une croissance avec des sources glycolytiques, en se fixant sur deux opérateurs que l'on retrouve au niveau du promoteur de ses gènes cibles (Licht *et al*, 2008; Licht & Brantl, 2009). Le gène *ccpN* se trouve en opéron avec le gène *yqfL*, lui aussi impliqué dans la régulation de *gapB* et *pckA*. YqfL est un régulateur positif indirect, par la modulation de l'activité de répresseur CcpN (Servant *et al*, 2005). Le signal qui permet cette régulation n'est pour le moment pas connu (**Figure 19**). CcpN a un rôle important dans le devenir du flux métabolique lors d'une croissance glycolytique. En effet, sa délétion entraîne une expression forte de *gapB* et *pckA* qui perturbe le flux et conduit à un fort défaut de croissance (Tännler *et al*, 2008). Cet effet est dû en partie à la création d'un cycle futile entre le PEP et l'oxaloacétate qui va consommer de l'ATP, mais surtout à un blocage au niveau de *gapA* et *gapB* qui va rediriger le flux vers la voie des pentoses phosphates (Tännler *et al*, 2008).

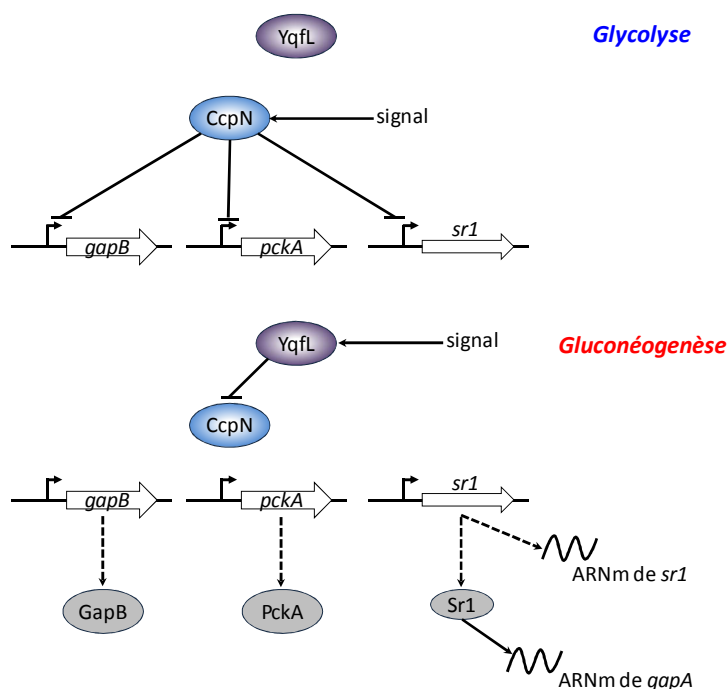


Figure 19 : Représentation schématique de la régulation par CcpN. Lors de la glycolyse, un signal inconnu agit sur CcpN et bloque l'expression des gènes *gapB*, *pckA* et *sr1*. Lors de la gluconéogenèse un signal inconnu agit sur YqfL et bloque l'activité de CcpN permettant l'expression de ses trois gènes cibles. La fixation de Sr1 à l'ARNm de *gapA* augmente sa stabilité.

Les actions régulatrices combinées de CggR et CcpN permettent donc d'orienter le flux métabolique dans le sens de la glycolyse ou dans le sens de la gluconéogenèse en fonction de l'état de la cellule et des sources de carbone disponibles. Ces deux régulateurs sont donc très importants pour l'adaptation de la bactérie à son environnement. Pour faciliter cette adaptation

on constate une certaine hétérogénéité de l'expression de *cggR* au sein d'une population de cellules lors d'une croissance avec des sources de carbone gluconéogéniques (Ferguson *et al*, 2012). Ainsi le système de répression de CggR sous forme de barrage pour l'ARN polymérase permet plus facilement la production d'ARNm même dans des conditions de répression. De plus, le fait que Srl soit capable de stabiliser l'ARNm de *gapA* dans des conditions de croissance gluconéogénique favorise cette adaptation. Donc, si une source de carbone glycolytique est ajoutée au milieu, une partie de la population bactérienne possède déjà à un niveau faible ces enzymes facilitant le passage à une croissance glycolytique. Cela procure un avantage adaptatif à cette sous-population. En revanche, la production de GapB et PckA réduisant fortement la croissance en présence de sources de carbone glycolytiques, leur production doit être très strictement régulée. C'est ce que l'on constate avec une régulation de CcpN plus stricte et avec une hétérogénéité plus faible de l'expression de ces gènes au sein d'une population lors d'une croissance avec des sources de carbone glycolytiques (Ferguson *et al*, 2012).

Résultats

IV Problématiques

Les travaux de cette thèse s'articulent autour de deux grands axes centrés sur le métabolisme du carbone. Ce métabolisme est central pour la croissance, le développement de la cellule et pour la synthèse de précurseurs pour de nombreuses voies anaboliques. Une meilleure compréhension de son fonctionnement et de sa régulation est donc importante pour permettre d'améliorer le rendement métabolique et de rediriger le flux métabolique vers les voies anaboliques d'intérêt. Cela peut représenter un intérêt industriel pour l'amélioration de la production par *B. subtilis*, utilisé comme usine biologique pour la fabrication de nombreux composés.

Historiquement, le laboratoire est très impliqué dans l'étude de la régulation du métabolisme central du carbone chez *B. subtilis* et a mis en évidence les régulations de l'opéron *gapA* par CggR (Doan & Aymerich, 2003) et de *gapB* et *pckA* par CcpN (Servant *et al*, 2005) (cf chapitre III.3.2). Il a aussi montré que le malate est une source préférentielle de carbone pour cet organisme au même titre que le glucose (Kleijn *et al*, 2010) et que cet acide est capable d'induire la répression catabolique *via* CcpA avec l'aide de HprK (Meyer *et al*, 2011b). Nous nous sommes alors demandés comment le malate déclenchait ce mécanisme de régulation. Deux hypothèses principales, non exclusives, pouvaient être formulées : (i) le flux de carbone lors de l'utilisation du malate conduit à l'activation de l'HprK comme lors de l'utilisation du glucose, notamment *via* l'augmentation du pool de FBP, ou/et (ii) l'une des enzymes de la voie d'utilisation du malate, ou une protéine encore inconnue fortement présente pendant l'utilisation du malate, est capable d'activer directement le complexe CcpA/HPr et/ou HprK. Pour étudier cette question, je me suis intéressé aux gènes spécifiques de la voie d'utilisation du malate et à leur implication possible dans la régulation par CcpA. Pour cela, j'ai observé l'effet de la délétion de ces différents gènes sur l'expression d'un gène d'utilisation d'une source de carbone glycolytique secondaire (le gène *bglp* codant le transporteur des β -glucosides), soumis à la répression catabolique par le glucose et le malate *via* CcpA, en utilisant un système rapporteur (*gfp*). En utilisant une méthode similaire, je me suis également intéressé à la régulation des gènes de transporteurs de sources de carbone gluconéogéniques soumis à la répression catabolique par le malate. Ces résultats seront discutés dans la deuxième partie de la thèse.

Le pyruvate est un métabolite important pour la cellule. Il est à la jonction entre la voie de la glycolyse et le cycle de Krebs et est impliqué dans la direction du flux métabolique. Il est également impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme la division cellulaire, la sporulation et la formation de biofilm. Ainsi nous nous sommes intéressés au transport du pyruvate.

Le projet européen BaSysBio auquel a participé notre laboratoire, a utilisé des technologies à haut débit et permis d'étudier l'intégralité du transcriptome de *B. subtilis* dans plus de cent conditions (Nicolas *et al*, 2012). Parmi ces conditions, l'une était la croissance sur un milieu minimum avec le pyruvate comme seule source de carbone. L'opéron *ysbAB* est le seul spécifiquement et fortement induit dans ces conditions et aucun autre gène ne présente cette spécificité. Les transporteurs étant généralement fortement induits en présence de la source de carbone qu'ils transportent, nous avons entrepris de tester l'hypothèse selon laquelle *ysbAB* code bien le transporteur principal du pyruvate. En utilisant une méthode de purification protéique en TAP-tag, nous avons pu déterminer les interactions entre YsbA et YsbB ainsi que leur localisation membranaire. Des expériences de physiologie ont ensuite montré que YsbAB permettait le transport spécifique du pyruvate. Enfin, en suivant l'activité d'un gène rapporteur (*gfp*) placé sous le contrôle du promoteur d'*ysbAB*, nous avons analysé la régulation de l'expression de cet opéron. Ces résultats seront discutés dans la première partie de cette thèse.

V Article

The dual regulation of a novel pyruvate transporter ensures pyruvate homeostasis in *Bacillus subtilis*

Teddy Charbonnier¹, Dominique Le Coq^{1,2}, Olivier Delumeau¹, Magali Calabre¹, Stéphane Aymerich¹ and Matthieu Jules^{‡1}

¹ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France; ² Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

[‡] corresponding author

Keywords: pyruvate, homeostasis, transport, *Bacillus subtilis*, CcpA

V.1 Abstract

Glucose and malate are the preferred carbon sources for *Bacillus subtilis* and impose a strict hierarchy in the use of alternative carbon sources via the catabolite repression. At the heart of the central carbon metabolism, pyruvate is a pivotal metabolite in all living cells. *B. subtilis* is able to use pyruvate as sole carbon source. We herein revealed that *ysbAB* (renamed in *pftAB*), the only operon specifically expressed in pyruvate-grown cells, encodes a membrane complex that operates as a novel family of facilitated transporters and corresponds to the major pyruvate transporter in *B. subtilis*. We then demonstrated that the previously uncharacterized LytST two-component system is responsible for the induction of *pftAB* in the presence of pyruvate by binding a palindromic region upstream *pftAB*. We showed that both glucose and malate trigger the CcpA-mediated catabolite repression of *pftAB*. However, an additional mechanism repressed *pftAB* in the presence of malate. We revealed that an active malic enzyme is required for this repression. We then demonstrated that the end-product of the malic enzyme reaction, *i.e.* intracellular pyruvate, triggers the malate-dependent, CcpA-independent catabolite repression of *pftAB* by hampering the LytST-mediated induction of *pftAB*. Overall, we evidence a complete system of sensors, feed-forward and feedback controllers that tightly manage pyruvate homeostasis.

V.2 Introduction

Pyruvate is a key metabolite for living cells as the end-product of glycolysis, a major substrate for oxidative metabolism, and a branching point for glucose, lactate, acetate, fatty acid and amino acid synthesis. Because it is at the junction of several essential pathways in both eukaryotic and prokaryotic cells, a tight control of its homeostasis and fate is crucial to ensure cell structural stability and robustness to changing environmental growth conditions. In eukaryotes, the mitochondrial enzymes that metabolize pyruvate are physically separated from the cytosolic pyruvate pool and rely on a transport system to shuttle pyruvate across the inner mitochondrial membrane. This transport system consists of a hetero-oligomeric complex composed of carriers MPC1 and MPC2. In prokaryotes, knowledge on pyruvate uptake systems is scarce. To date, two monocarboxylate transport systems with low affinity for pyruvate have been identified and characterized, MctC in *Corynebacterium glutamicum* (Jolkver *et al*, 2009) and MctP in *Rhizobium leguminosarum* (Hosie *et al*, 2002). Although *Bacillus subtilis*, the model for the Gram-positive bacteria, is able to grow on pyruvate as sole carbon source (Chubukov *et al*, 2013), no clear homolog with any of the bacterial pyruvate transporters was found in its genome (Kunst *et al*, 1997).

We recently analyzed the contribution of transcriptional regulation to metabolic flux adjustments in *B. subtilis* cells grown on two types of substrates, glycolytic (*e.g.* glucose) and gluconeogenic (*e.g.* malate) (Chubukov *et al*, 2013). The expression of the genes encoding the known transporters of gluconeogenic carbon sources were activated in the presence of only the cognate carbon source in the medium via two-component systems (TCSs; *e.g.* *maeN* by MalK/R (Tanaka *et al*, 2003)). The co-assimilation of carbon sources in bacteria is strictly controlled by the carbon catabolite repression (CCR). In *B. subtilis*, glucose and malate are the two preferred carbon sources and therefore impose a strict hierarchy for the use of alternative carbon sources (Kleijn *et al*, 2010). At the transcriptional level, the glucose-mediated CCR operates *via* CcpA and its cofactors (HPr and Crh) to repress transcription of several targets, among which are the genes encoding the transporters of alternative carbon sources (Meyer *et al*, 2011b). We recently showed that malate represses the co-utilization of alternative, glycolytic substrates by hijacking the usual glucose-mediated CcpA-dependent catabolite repression mechanism (Kleijn *et al*, 2010; Meyer *et al*, 2011b). The carbon-specific gene regulatory networks together with the global mechanism of catabolite repression can be viewed as sensors, feed-forward and feedback controllers that tightly manage resource allocation and fluxes within cells and adapt the overall metabolism to their changing

environment. In the present work, we identified the first bacterial transporter specific for pyruvate, we characterized its regulation and revealed that this system directly contributes to proper pyruvate homeostasis.

V.3 Results

V.3.1 The *B. subtilis* *ysbAB* (*pftAB*) operon encodes a membrane protein complex essential for growth on pyruvate

To identify genes coding the pyruvate uptake system of *B. subtilis*, we performed a comparative analysis of two transcriptome datasets corresponding to metabolically closely-related growth conditions, pyruvate (M9P) and succinate plus glutamate (M9SE) media (Chubukov *et al*, 2013). As shown on **Figure 20A**, the comparative analysis revealed that *ysbA* and *ysbB* were the only specifically induced genes in cells grown in M9P as compared to cells grown in M9SE. The *ysbA* and *ysbB* genes are transcribed as an operonic structure (Nicolas *et al*, 2012). In order to check whether *ysbA* and/or *ysbB* are essential for growth of *B. subtilis* on pyruvate, we constructed single and double KO mutant strains (**Tableau 4**). To avoid polar effect of *ysbA* KO, we reinserted upstream *ysbB* the native P_{ysbA} promoter sequence (**Tableau 4**). The deletion of either *ysbA*, *ysbB* or *ysbAB* resulted in loss of the ability to grow in M9P (**Figure 20B**). These strains did not show any phenotype different from the wild-type (WT) strain when grown on other substrates (*e.g.* glucose, M9G; malate, M9M; and M9SE; **Tableau 1**). Complementation by an IPTG-inducible *ysbAB* cassette ($P_{hs,ysbAB}$) inserted at the *amyE* locus restored growth on M9P (**Figure 20B**, **Tableau 1**) to the WT level (0.25 h^{-1}).

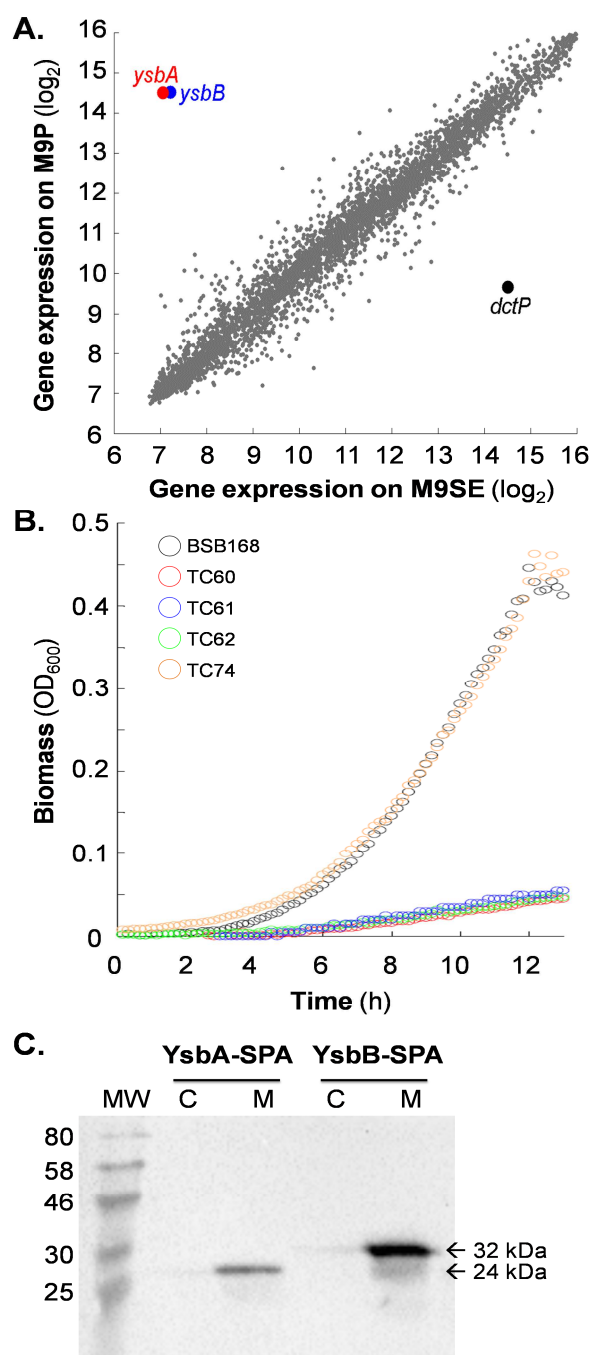


Figure 20. Expression, role and localization of *ysbAB* (*pftAB*) during growth of *B. subtilis* cells on pyruvate. **A.** Comparative gene expression analysis (grey dots) between cells grown on pyruvate (M9P) versus succinate plus glutamate (M9SE). The *ysbA* (red dot) and *ysbB* (blue dot) genes are specifically expressed on M9P; the *dctP* (black dot) gene encoding the major C4-dicarboxylate permease is specifically expressed on M9SE. Data were extracted from (Chubukov *et al*, 2013, Nicolas *et al*, 2012) and reanalyzed. **B.** Growth of the WT (black), Δ *ysbA* (green), Δ *ysbB* (blue), Δ *ysbAB* (red) and Δ *ysbAB* *P_{hs}ysbAB* (orange) strains on M9P. **C.** Cytoplasmic versus membrane localization of YsbA-SPA (24 kDa) and YsbB-SPA (32 kDa). Cells were grown in M9SE+P. Western-blot was performed using an anti-FLAG monoclonal antibody as primary antibody and HR-conjugated anti-mouse antibody as secondary. A representative experiment is presented on each panel.

Tableau 1 Growth rates measured in minimal media with various carbon sources from 96-well microtiterplates

Strain	Growth rate (μ , h ⁻¹)			
	M9P	M9G	M9M	M9SE
BSB 168	0.25 ± 0.08	0.74 ± 0.04	0.83 ± 0.05	0.52 ± 0.08
TC58	- ^b	0.67 ± 0.03	0.80 ± 0.04	0.52 ± 0.08
TC60	- ^b	0.70 ± 0.03	0.80 ± 0.05	0.49 ± 0.04
TC61	- ^b	0.71 ± 0.01	0.78 ± 0.04	0.52 ± 0.05
TC62	- ^b	0.72 ± 0.03	0.79 ± 0.04	0.53 ± 0.05
TC73 ^a	0.28 ± 0.07	0.67 ± 0.02	0.78 ± 0.03	0.56 ± 0.03
TC74 ^a	0.25 ± 0.05	0.66 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.47 ± 0.06
TC75 ^a	0.26 ± 0.04	0.62 ± 0.07	0.76 ± 0.05	0.45 ± 0.06
TC76 ^a	0.25 ± 0.05	0.65 ± 0.06	0.76 ± 0.04	0.47 ± 0.08

^a the growth medium was supplemented with IPTG 200 μ M for functional complementation.

^b cryptic growth (*i.e.* non exponential growth and low biomass final titer, see Figure 20B).

Both YsbA and YsbB were predicted to be membrane proteins (**Figure 21A**). To validate this localization, we used *B. subtilis* cells expressing SPA-tagged YsbA and YsbB and analyzed samples corresponding to the cytosolic and membrane fractions by western-blot using anti-FLAG antibodies. The results showed that both YsbA-SPA and YsbB-SPA were mainly present in the membrane (**Figure 20C**). We next asked whether YsbA and YsbB form a protein complex in the membrane. We performed tandem affinity purification (TAP) using the SPA-tagged YsbA and YsbB expressing strains and appropriate control strains. Strains were grown in M9P and the purified (YsbA-SPA and YsbB-SPA) and co-purified proteins were identified using mass spectrometry after trypsin or trypsin/chymotrypsin digestions. We were unable to detect YsbA in the tandem affinity-purified sample containing SPA-tagged YsbB, most probably due to the fact that the trypsin and trypsin/chymotrypsin digestions of YsbA only generates poorly detectable peptides (as predicted by *in silico* digestion). However, YsbB was specifically detected in the sample containing SPA-tagged YsbA (**Figure 21B**). Altogether, our results strongly suggested that YsbA and YsbB form a hetero-oligomeric membrane complex.

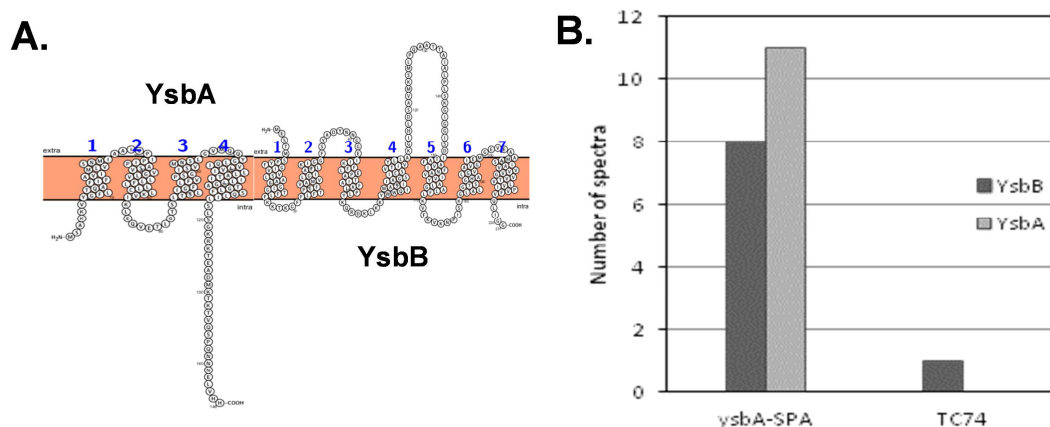


Figure 21. The YsbA/YsbB protein complex. **A.** The YsbA and YsbB transmembrane domain predictions were performed with the Protter software (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>). Each blue number represents a putative transmembrane domain. **B.** Based on spectral counting the quantity of YsbB that is co-purified with YsbA-SPA after tandem affinity purification of the latest is shown. As a control, we applied a mocked tandem affinity purification with a membrane preparation from *Bacillus subtilis* 168 wild-type strain. A representative experiment is presented.

V.3.2 The YsbAB (PftAB) membrane complex operates as a facilitated transporter of pyruvate

We asked whether *ysbAB* encodes a pyruvate uptake system. To this end, we tested for functional complementation of the *C. glutamicum mctC* mutant (deficient for growth on pyruvate, (Jolkver *et al*, 2009)) using an IPTG-inducible *ysbAB* expression plasmid. The expression of *ysbAB* was induced using IPTG at low (50 μ M), intermediate (100 and 150 μ M) and high (1 mM) concentrations. As shown on **Figure 22A**, the *mctC* mutant transformed with the empty plasmid was unable to grow on pyruvate as sole carbon source. However, the IPTG-inducible expression of *ysbAB* was able to partially restore growth of the *mctC* mutant. At low and intermediate levels of *ysbAB* induction (50, 100 and 150 μ M IPTG), the biomass reached an OD₆₀₀ up to ~0.6 unit and the rates of growth were comprised between 0.04 and 0.06 h⁻¹. At high induction level (1mM IPTG), the biomass reached an OD₆₀₀ of ~0.9 and the growth rate was of $\sim 0.08 \pm 0.01$ h⁻¹ (in comparison with an OD₆₀₀ of ~1 and a growth rate of ~ 0.15 h⁻¹ for the control strain). These results indicated that *ysbAB* encode a pyruvate transport system.

We next determined whether YsbAB operates as an active or passive pyruvate transport system. A straightforward approach to experimentally address this issue is to evaluate whether the YsbAB complex transports pyruvate along or against the concentration gradient of pyruvate. We first verified if YsbAB could export intracellular pyruvate into the growth medium in the absence of extracellular pyruvate. It is well-known that during growth

on glucose or malate, *B. subtilis* cells excrete pyruvate prior its (re)assimilation when the carbon source is depleted (Chubukov *et al*, 2013; Buescher *et al*, 2012). We thus quantified the extracellular pyruvate concentrations during growth in M9G of the WT, $\Delta ysbAB$ and $P_{hs} ysbAB$ strains. The three strains exhibited identical growth phenotype (**Figure 22B**) The pyruvate concentration measured in the growth medium of the WT and $\Delta ysbAB$ strains steadily increased until the late exponential phase to about 0.03 g.L^{-1} ($\sim 0.34 \text{ mM}$) with a specific production rate (q_{Pyr}) of $\sim 0.5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$. Afterwards, the pyruvate concentration dropped to zero, which suggests that cells rapidly used pyruvate before entering stationary phase. For the IPTG-inducible *ysbAB* expression strain, the pyruvate concentration culminated at $\sim 0.09 \text{ g.L}^{-1}$ ($\sim 1.02 \text{ mM}$) after seven hours of culture (**Figure 22B**). The specific production rate of pyruvate (q_{Pyr}) peaked at $\sim 5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$ after four hours of culture and quickly decreased thereafter. The specific glucose consumption and specific acetate and citrate production rates did not show any differences between the three strains (**Figure 23C, D, E**). These results indicated that YsbAB can efficiently export pyruvate, and that there exists at least another pyruvate transport system allowing the import and export of pyruvate.

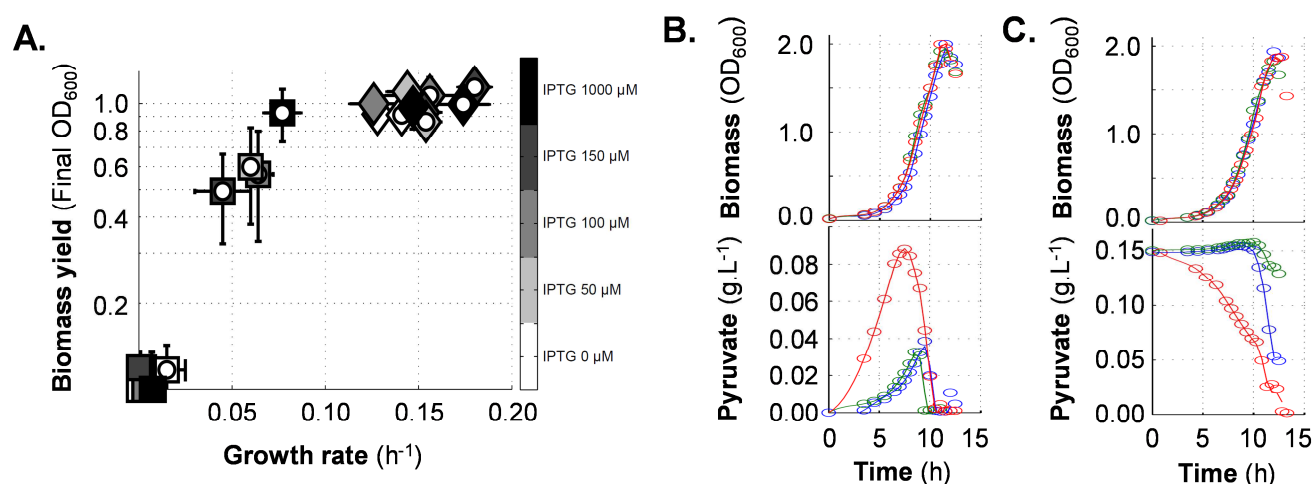


Figure 22. Functional characterization of the YsbAB (PftAB) pyruvate transporter. A. Growth in MM1+pyruvate of the *C. glutamicum* WT (diamonds) and $\Delta mctC$ (squares) strains transformed with the empty pXMJ19 (filled symbols) or pXMJ19-*ysbAB* (white inset in symbols) plasmids. Expression of *ysbAB* was induced using different IPTG concentrations (grey color bar). Mean values of at least six independent experiments with standard deviations are presented. B. and C. Growth of the *B. subtilis* WT (blue), $\Delta ysbAB$ (green), and $\Delta ysbAB P_{hs} ysbAB$ (red) strains and corresponding concentrations of extracellular pyruvate. Only a representative experiment is shown. B. Cells were grown in M9G with 200 μM IPTG. C. Cells were grown in M9G with 200 μM IPTG and 0.15 g.L⁻¹ pyruvate.

The intracellular concentration of pyruvate of *B. subtilis* cells grown in glucose minimal medium is about 1 mM (Li *et al*, 2012), which suggests that the gradient of pyruvate drove the YsbAB-mediated pyruvate export till extracellular and intracellular pyruvate concentrations reached an equilibrium. To verify this assumption, we cultivated the very same

strains in M9G with 0.15 g.L^{-1} ($\sim 1.70 \text{ mM}$) of pyruvate (**Figure 22C**). In this experiment, the concentration of pyruvate is slightly higher than the extracellular concentration resulting from the export of pyruvate by *ysbAB* overexpressing cells (as observed on **Figure 22B**) and higher than the intracellular pyruvate concentration of WT cells grown in M9G. As shown on **Figure 22C**, the concentration of pyruvate measured in the growth medium of the WT strain showed a slight increase till ten hours of culture followed by a drop as soon as cells entered stationary phase. Interestingly, this drop coincided with the induction of *ysbAB* when glucose was depleted (see next paragraphs). Consistently, in the $\Delta ysbAB$ strain the pyruvate consumption was delayed and strongly reduced. However, in the IPTG-inducible *ysbAB* expression strain, the extracellular pyruvate concentration dropped from the beginning of the culture to reach zero before the entry into stationary phase (**Figure 22 C**). The specific glucose consumption and specific acetate and citrate production rates did not show any differences between the three strains (**Figure 23 H, I, J**). Making use of a simple model of facilitated transport and of the growth conditions described above, we estimated that the YsbAB complex had a maximum rate (J_{\max}) of about $10.0 \pm 1.0 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gCDW}^{-1}$ and an apparent affinity constant for pyruvate (K_M) of about $1.0 \pm 0.1 \text{ mmol.L}^{-1}$. Altogether, these results demonstrated that YsbAB primarily mediated the import of pyruvate in the presence of extracellular pyruvate. We therefore renamed *ysbAB* in *pftAB* for *pyruvate facilitated transporter*.

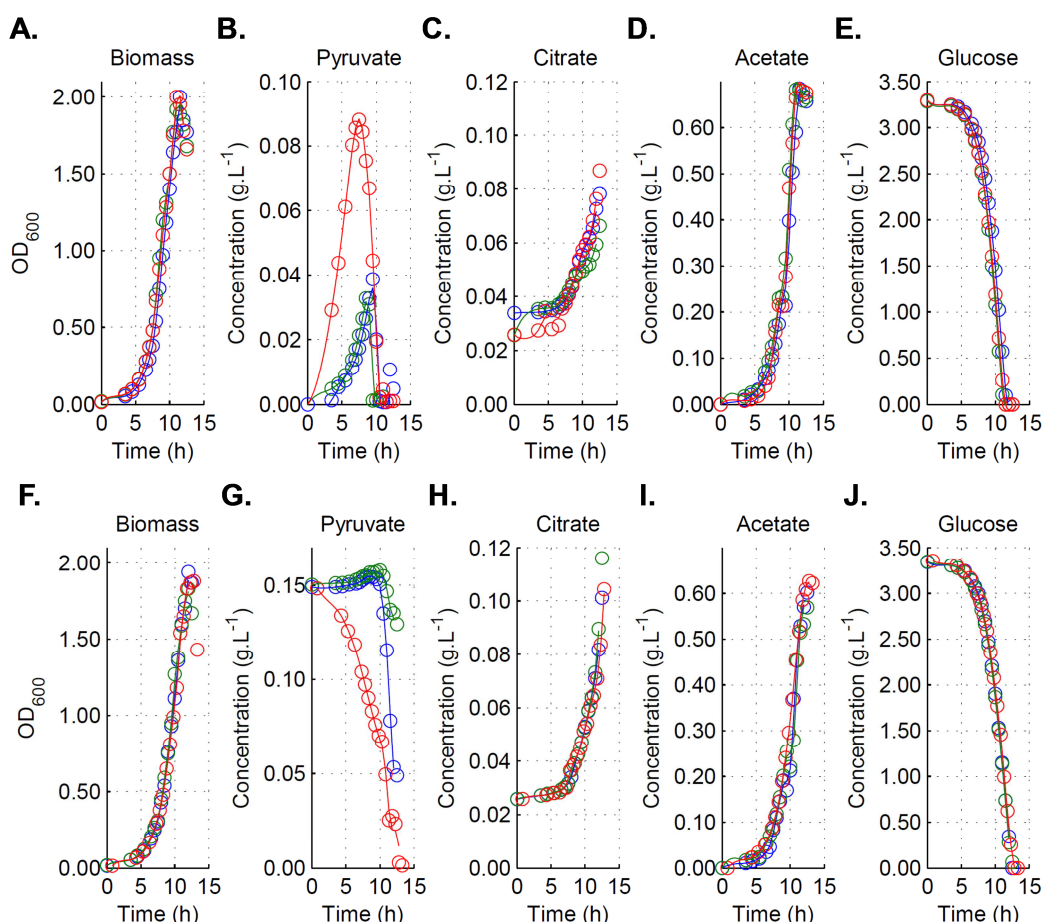


Figure 23. Growth of various strains and corresponding extracellular metabolite concentrations. The WT (bleu circles), $\Delta ysbAB$ (green circles), and $P_{hsy} ysbAB$ (red circles) strains were cultivated on M9G plus 200 μM IPTG (A to E) or M9G plus 0.15 g.L^{-1} pyruvate and 200 μM IPTG (F to J). The growth curves for M9G and M9G + 0.15 g.L^{-1} pyruvate are shown in panel A and F, respectively. The extracellular concentration of pyruvate (maximum specific production rate, $q_{Pyr}^{max} \sim 5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$), citrate ($q_{Cit}^{max} \sim 0.1 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$), acetate ($q_{Ace}^{max} \sim 5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$) and glucose (maximum specific consumption rate, $v_{Glc}^{max} \sim 8 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$) on M9G are shown on panel B, C, D and E, respectively. Extracellular concentration of pyruvate ($v_{Pyr}^{max} \sim 2 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$), citrate ($q_{Cit}^{max} \sim 0.1 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$), acetate ($q_{Ace}^{max} \sim 5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$) and glucose ($v_{Glc}^{max} \sim 8 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$) on M9G + 0.15 g.L^{-1} pyruvate are shown on panel B, C, D and E, respectively. A representative experiment is presented on each panel.

V.3.3 The *LytST* TCS induces *pftAB* expression in the presence of pyruvate.

Since PftAB can import and export pyruvate, its expression must be tightly regulated to ensure proper pyruvate homeostasis. Two genes, *lytS* and *lytT*, encoding for a putative TCS (Kunst *et al*, 1997) are located immediately upstream from *pftAB* on the *B. subtilis* chromosome (Figure 24A). They are weakly but constitutively expressed in exponential growth conditions and transcribed as an operonic structure (Nicolas *et al*, 2012). We questioned whether this operon is involved in pyruvate utilization and constructed the $\Delta lytST$ strain (Tableau 4). The $\Delta lytST$ strain was unable to grow on pyruvate and no growth defect was observed when replacing pyruvate by other substrates (Tableau 1). To verify whether

LytST is responsible for the induction of *pftAB* in the presence of pyruvate, we constructed a *gfp* transcriptional fusion reporting the promoter activity of *pftAB* ($P_{pftABgfp}$) and inserted it at the *pftAB* locus in both the $\Delta lytST$ and WT strains (**Tableau 4; Figure 24B**). Because the $\Delta lytST$ strain does not grow in M9P, cells were grown in M9SE \pm P. The GFP abundance was of $\sim 4.5 \text{ U.OD}_{600}^{-1}$ for WT cells grown in M9SE+P and barely detectable in M9SE (**Tableau 2**). By contrast, the GFP abundance was of $\sim 0.5 \text{ U.OD}_{600}^{-1}$ for the $\Delta lytST$ strain in both conditions (**Tableau 2**), which indicated that LytST is involved in the induction of *pftAB* expression. Performing *in silico* comparative-genomic analysis, Leyn *et al.* recently proposed putative binding sites for a series of TCSs of unknown functions (Leyn *et al.*, 2013). Based on these predictions, LytT may bind a DNA sequence located upstream of the *pftAB* promoter and composed of two boxes of 12 nucleotides separated by 9 nucleotides (**Figure 24B**). We constructed *gfp* transcriptional fusions with the *pftAB* promoter mutated for the two putative boxes either independently or together. The GFP abundance from the three reporter strains grown in M9SE+P dropped as much as in the $\Delta lytST$ strain (**Tableau 2**). Altogether, these results prompted us to conclude that each of the two predicted boxes is essential for the induction of *pftAB* by the LytST TCS.

Tableau 2. Induction of *pftAB* by the LytST TCS.

Genotype ^a	P_{pftAB} expression (U.OD_{600}^{-1}) ^b	
	M9SE	M9SE+P
WT	0.2 ± 0.3	4.4 ± 0.2
$\Delta lytST$	0.7 ± 0.5	0.3 ± 0.4
$P_{pftAB-\Delta lytT1}$	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.2
$P_{pftAB-\Delta lytT2}$	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.1
$P_{pftAB-\Delta lytT1-2}$	0.5 ± 0.7	0.4 ± 0.3

^a The two deleted LytT binding sites are described in Figure 24.

^b Mean values of at least 6 replicates with standard deviations.

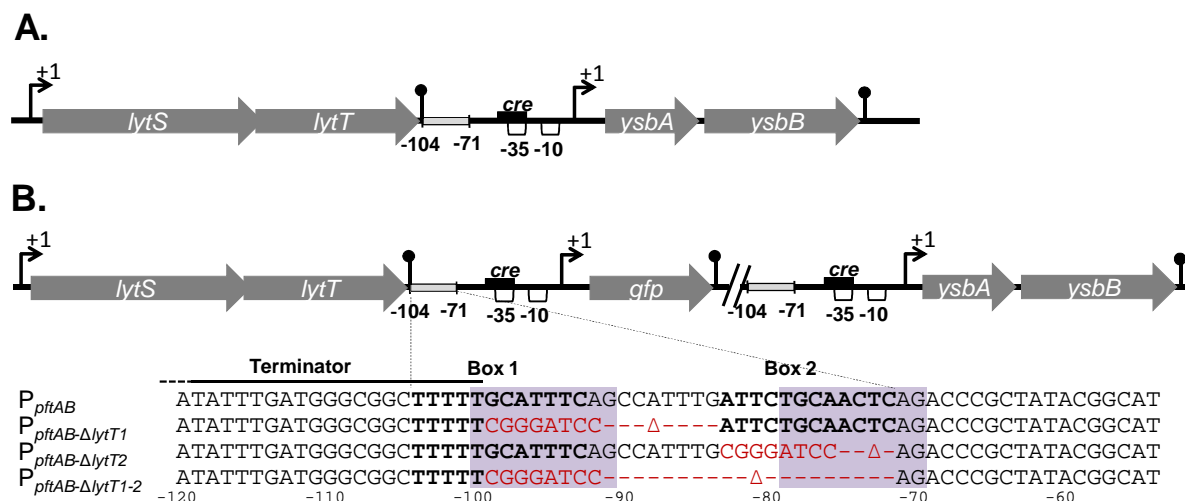


Figure 24. The LytST TCS binding site. A. Genomic organization of the *lytST ysbAB* region. The black box indicates the putative *cre* site for CcpA binding. The light grey box indicates the binding region of LytT. **B.** The binding region of LytT is detailed for the unmodified (P_{ysbAB}), Box1-deleted (P_{pftAB-ΔlytT1}), Box2-deleted (P_{pftAB-ΔlytT2}) and Box1-2 -deleted (P_{pftAB-ΔlytT1,2}) reporter strains. Black bold letters stand for the two putative LytT DNA binding sequences (Box1, Box2) based on reference (Leyn *et al*, 2013). The red letters indicate the DNA sequence that replaced the deleted region in each strain. The violet shaded regions are similar to the binding sites identified in *E. coli* for the LytT-like YpdA response regulator (Fried *et al*, 2013).

V.3.4 Malate represses transcription of *pftAB* by a malic enzyme-dependent but CcpA-independent mechanism.

To verify whether *pftAB* expression is under the control of the CcpA-dependent catabolite repression, we quantified the P_{pftAB}*gfp* expression level in the WT, Δ*ccpA*, *ptsHI*, Δ*crh* and *ptsHI* Δ*crh* strains under inductive or repressive conditions (**Tableau 3**). The deletion of *ccpA* fully relieved the glucose-mediated repression of *pftAB* in M9P+G, which is consistent with the presence of a putative *cre* box overlapping the -35 region of the promoter (**Figure 24A**). As expected, the glucose-mediated repression of *pftAB* was maintained in the *ptsHI* and Δ*crh* single mutant strains, which confirmed that the two co-factors can functionally replace each other (**Tableau 3**). Consistently, the glucose-mediated *pftAB* repression was significantly reduced in the *ptsHI* Δ*crh* double mutant. Unexpectedly however, the malate-mediated repression was not relieved in the Δ*ccpA* mutant nor in any of the Δ*ccpA*, *ptsHI*, Δ*crh* and *ptsHI* Δ*crh* mutants (M9P+M medium, **Tableau 3**). Glucose thus repressed transcription of *pftAB* via CcpA and its cofactors while malate repressed *pftAB* transcription by at least one CcpA-independent mechanism.

Tableau 3. CcpA-dependent and independent catabolite repressions of *pftAB*.

Genotype	P_{pftAB} expression (U.OD ₆₀₀ ⁻¹) ^a				
	M9G	M9M	M9P	M9P+G	M9P+M
WT	<0.1	0.6 ± 0.1	4.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2
$\Delta ccpA$	<0.1	0.3 ± 0.2	4.8 ± 0.2	3.5 ± 0.5	0.4 ± 0.1
<i>ptsH1</i>	<0.1	0.5 ± 0.2	4.9 ± 0.6	<0.1	0.9 ± 0.2
Δcrh	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1	5.3 ± 0.6	<0.1	1.0 ± 0.2
<i>ptsH1</i> Δcrh	<0.1	0.2 ± 0.1	4.8 ± 0.5	2.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1
$\Delta ccpA$ $\Delta maeA$	-	-	4.9 ± 0.2	-	4.8 ± 0.5
$\Delta ccpA$ $\Delta ywkB$	-	-	4.9 ± 0.6	-	0.6 ± 0.1
$\Delta ccpA$ $\Delta maeA$ $P_{hs} malS$	-	-	4.4 ± 0.4	-	3.7 ± 0.3
$\Delta ccpA$ $\Delta maeA$ $P_{hs} malS + I^b$	-	-	5.2 ± 0.4	-	0.4 ± 0.2

^a Mean values of at least 6 replicates with standard deviations. '-' not determined.

^b I: Inducer. Overexpression of *malS* was carried out using 200 μ M IPTG.

To identify this CcpA-independent catabolite repression system, a mini-Tn10 insertion library was constructed from a *B. subtilis* *pftAB* reporter strain in a $\Delta ccpA$ background. This library was then screened on plates for *pftAB* derepression in the presence of malate. Thirteen positive clones from six independent pools of transposants were isolated and further characterized (**Figure 25**). Most of the clones with strong *pftAB* derepression were mutated in the TCS *malK/R* and its regulon involved in malate transport (*maeN*) and utilization (*maeA*) (Tanaka *et al*, 2003; Doan *et al*, 2003). As *maeA* is the first gene of the *maeA-ywkB* operon, a possible role of *ywkB* could not be excluded. We thus analyzed the effect of the deletion of each gene. The inactivation of *maeA* fully relieved *pftAB* expression in M9P+M, while the inactivation of *ywkB* had no significant effect (**Tableau 3**). These results showed that the CcpA-independent malate-dependent repression requires *maeA*.

B. subtilis possesses four paralogous malic enzymes: YtsJ, a NADP-dependent malate dehydrogenase, plays the major role in malate utilization, whereas MaeA, MalS and MleA are NAD-dependent and are dispensable for growth on malate (Lerondel *et al*, 2006). In order to test whether the MaeA protein itself or the NAD-dependent malic enzyme activity was required for the malate-dependent CcpA-independent catabolite repression of *pftAB*, we replaced MaeA by another NAD-dependent malic enzyme. The overexpression of *malS* in a $\Delta maeA$ strain restored repression of *pftAB* up to the WT level (**Tableau 3**). Altogether our results indicated that the NAD-dependent malic enzyme activity but not the MaeA protein is essential to drive the malate-dependent CcpA-independent repression of *pftAB*.

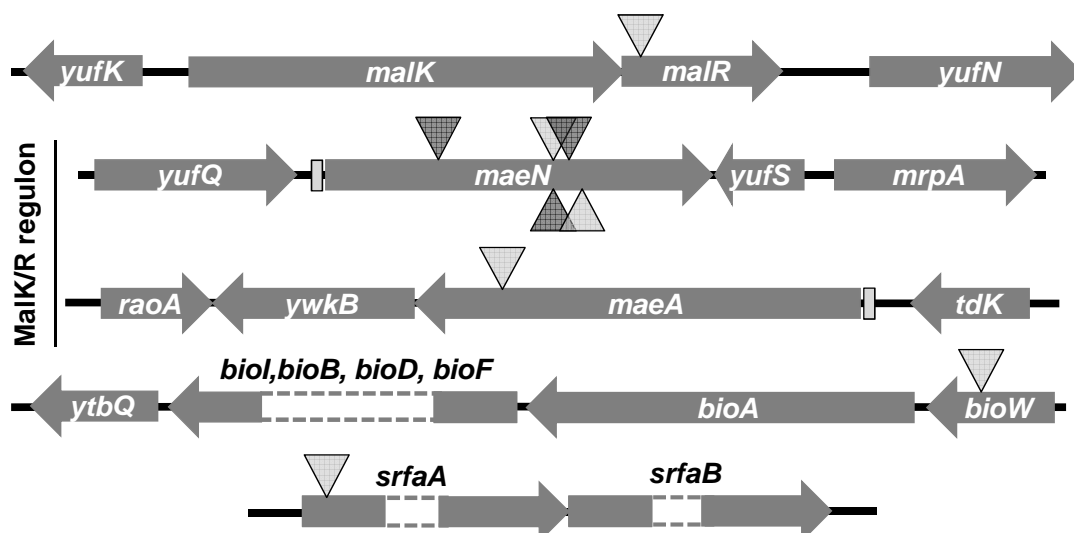


Figure 25. Transposon mutagenesis identified genes involved in the malate-induced CcpA-independent catabolite repression of *ysbAB*. Genes identified with random mutagenesis by transposition (~14000 clones screened). The insertion sites of the mini-Tn10 transposon in the *B. subtilis* genome are indicated as follows: the light gray triangles indicate an insertion in one clone and the dark gray triangles indicate one insertion in two independent clones. Genes *malK*, *malR*, *maeN* and *maeA* are involved in the malate assimilation pathway with the *malKR* operon that encodes a two component system, *maeN* encoding for the principal malate transporter and *maeA* encoding a malic enzyme. The expression of *maeN* and *maeA* are under the control the MalKR two component system, and the binding sites of MalR are indicated as light grey boxes upstream *maeA* and *maeN*. The gene *srfaA* is involved in surfactin production and the gene *bioW* is the first gene of an operon encoding enzymes of the pathway for biotin synthesis.

V.3.5 Intracellular pyruvate hinders the extracellular pyruvate-dependent induction of *pftAB* by LytST.

The NAD-dependent malic enzyme MaeA catalyzes the transformation of malate into pyruvate (Chubukov *et al*, 2013). This prompted us to hypothesize that the end-product of the reaction (*i.e.* intracellular pyruvate) is mediating the CcpA-independent catabolite repression. To test this hypothesis, we altered the concentration of intracellular pyruvate in the absence of extracellular malate by two complementary means making use of the kinetic properties of the PftAB transport system. $P_{pftAB}gfp$ reporter cells were grown in M9SE supplemented with different concentrations of pyruvate and the rate of pyruvate uptake was controlled by modulating the level of PftAB (using the WT, $\Delta pftAB$ and $P_{hs}pftAB$ strains; **Figure 26A**). The $\Delta pftAB$ strain cannot uptake pyruvate and has supposedly less intracellular pyruvate than a strain expressing *pftAB*. We thus expected the P_{pftAB} activity to be lower in the WT and $P_{hs}pftAB$ strains than in the $\Delta pftAB$ mutant if the intracellular pyruvate concentration negatively affected *pftAB* expression. GFP abundances in the WT and $\Delta pftAB$ strains were similar for extracellular pyruvate concentrations below 1mM. For higher extracellular pyruvate concentrations, GFP abundance increased up to 14 U.OD₆₀₀⁻¹ in the $\Delta pftAB$ strain but slowly decreased down to 4 U.OD₆₀₀⁻¹ in the WT. Remarkably, GFP abundance in the

IPTG-induced $P_{hs}pftAB$ strain peaked at $\sim 11 \text{ U.OD}_{600}^{-1}$ for an extracellular pyruvate concentration of about 1mM and dropped afterwards down to $\sim 1 \text{ U.OD}_{600}^{-1}$ (**Figure 26A**). These results indicated that, although extracellular pyruvate triggered the induction of $pftAB$, this induction is strongly inhibited (14-fold between the $\Delta pftAB$ and $P_{hs}pftAB$ strains) by the activity of PftAB, *i.e.* by pyruvate uptake and increasing intracellular pyruvate concentration. It is worth to note that this feedback regulation led to a repression of $pftAB$ of $\sim 90\%$, similar to the repression exerted in the presence of malate. Taken together, our results suggested that the malate-dependent, CcpA-independent catabolite repression of $pftAB$ only resulted from the increase of intracellular pyruvate via the strong malate-dependent induction of MaeA.

No other DNA-binding regulatory protein than MalR was identified by our transposon mutagenesis. We therefore wondered whether the CcpA-independent repression of $pftAB$ was mediated by the LytST TCS itself, *i.e.* by reducing its induction activity. In order to verify this assumption, we constructed a synthetic fusion combining the IPTG-inducible P_{hs} with the native P_{pftAB} upstream of the *gfp* gene ($P_{hs}P_{pftAB}gfp$, **Figure 26B**). If the CcpA-independent catabolite repression of $pftAB$ is mediated by LytST, the expression of this reporter system will be fully relieved in the presence of IPTG. By contrast, if it is mediated by an unknown DNA-binding regulator acting on or downstream of P_{pftAB} , the expression from the upstream P_{hs} should be hindered by this regulator acting as a roadblock. As shown on **Figure 26C**, the $P_{hs}P_{pftAB}gfp$ synthetic construct in the WT genetic background maintained the repression observed in the presence of malate with or without IPTG. However in the $\Delta ccpA$ mutant, while the malate-mediated CcpA-independent repression of $pftAB$ was maintained in the absence of IPTG, the $pftAB$ repression was fully relieved in the presence of IPTG (**Figure 26C**) This experiment revealed that CcpA repressed $pftAB$ expression in the presence of malate by binding on the downstream $pftAB$ promoter and acting as a roadblock on the transcribing RNA polymerase for the P_{hs} (**Figure 26B**). These results also demonstrated that there is no other DNA-binding protein that specifically repressed $pftAB$ in the presence of malate. As a consequence, we concluded that the CcpA-independent $pftAB$ repression corresponded to a lower level of induction of $pftAB$ by LytST, hence revealing an opposite transcriptional control to ensure pyruvate homeostasis.

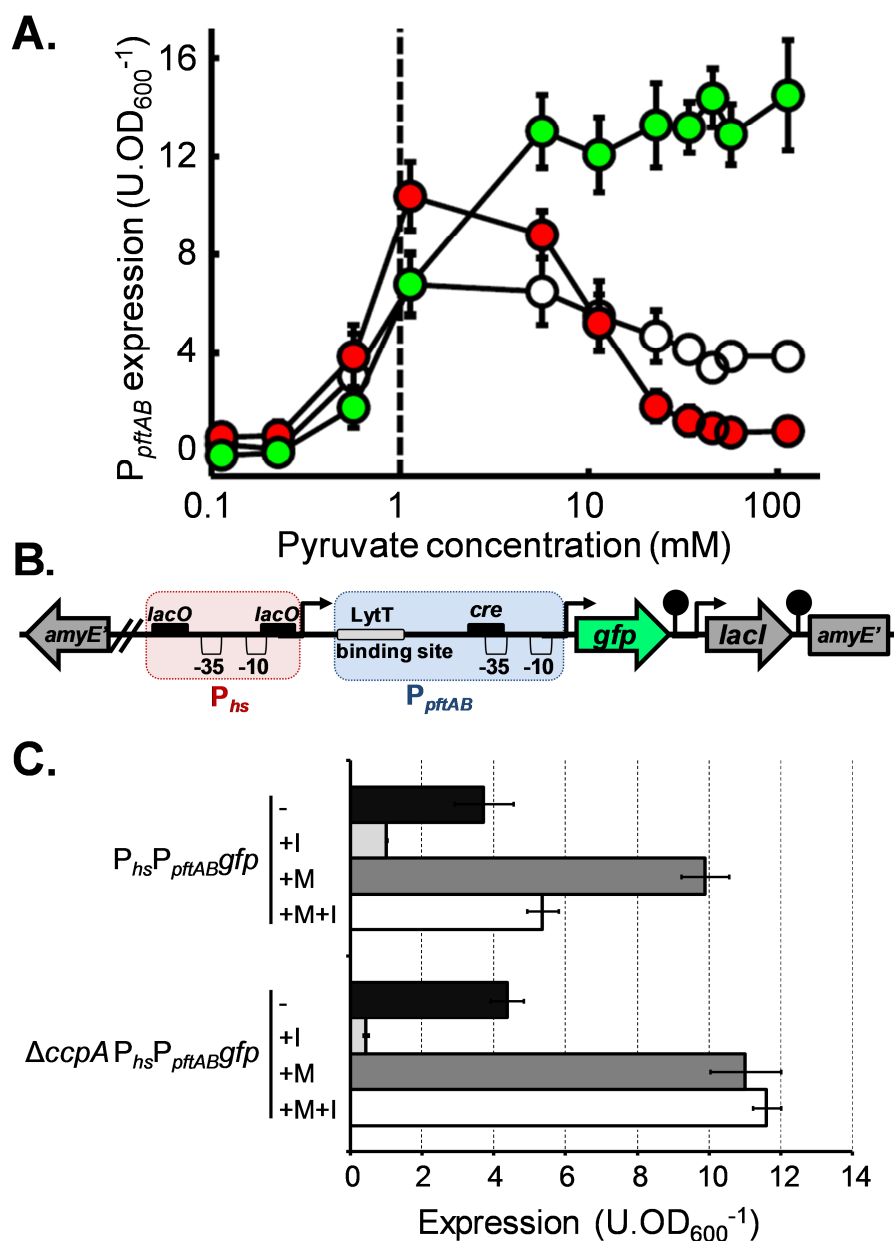


Figure 26. Pyruvate influx tightly controls *pftAB* expression. **A.** Expression of *pftAB* in the WT (white), $\Delta pftAB$ (red) and $P_{hs}pftAB$ (green, 1 mM IPTG) strains grown in M9SE plus pyruvate (at concentrations ranging from ~0.1 to ~100 mM). The dashed line represents the estimated K_M of PftAB. **B.** Genomic structure of the $P_{hs}P_{pftAB}gfp$ at the *amyE* locus. The red and blue boxes represent P_{hs} and P_{pftAB} , respectively. Black boxes indicate DNA binding sites: *cre* for CcpA and *lacO* for LacI. **C.** Expression of $P_{hs}P_{pftAB}gfp$ in the WT and $\Delta ccpA$ strains grown in M9SE+P±M±I (I: 200 μ M IPTG). Mean values of at least six experiments with standard deviations are presented on panels A and C.

VI Régulation de l'entrée des sources de carbone gluconéogéniques

VI.1 Rôle de *ccpA* et *lytST* lors de la croissance en milieu minimum.

Pour tenter de déterminer les mécanismes de la régulation de l'opéron *pftAB* lors d'une croissance sur un milieu minimum avec du pyruvate et du malate comme sources de carbone, j'ai construit une souche dans lesquelles *lytST* et *ccpA* ont été délétés (TC180). Ainsi, nous avons constaté que CcpA était très probablement le seul régulateur transcriptionnel agissant sur *pftAB* en dehors du système à deux composants *lytST*. En milieu riche tel que le LB, ces souches ne présentent pas de défaut de croissance. De même, ni le simple mutant *ccpA* ni le double mutant *ccpA/pftAB* n'ont une croissance affectée. En revanche, nous avons constaté que la souche TC180 était incapable de croître sur milieu minimum quelle que soit la source de carbone présente (pyruvate, malate, ou glucose). Il existe donc une co-létalité en milieu minimum de l'inactivation du gène *ccpA* et de l'opéron *lytST*.

La délétion de *ccpA* est cependant connue pour entraîner un défaut de croissance qui peut être compensé par l'addition de certains acides aminés (isoleucine, leucine, méthionine, valine et glutamate) (Ludwig *et al*, 2002). Nous avons alors émis l'hypothèse que la létalité des doubles mutants pouvait être liée à l'absence d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s) devenu(s) essentiel(s) lorsqu'à la fois *ccpA* et *lytST* sont délétés. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai cultivé différents simples et double mutants dans un milieu M9 contenant du malate comme source de carbone, complémenté par du LB (dilué dix fois), ou de l'extrait de levure, ou de l'hydrolysate de caséine (à 0.1% et 0.01%). J'ai alors observé qu'en présence de LB, extrait de levure ou de l'hydrolysate de caséine à 0.1%, la croissance était restaurée, indiquant un rôle d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s) dans cette co-létalité.

VI.2 Régulation de l'entrée des sources de carbone gluconéogéniques par le malate.

Nous avons montré que la répression de l'expression de *pftAB* en présence de malate passait par son système à deux composants, et était liée à la quantité de pyruvate intracellulaire. L'ensemble des gènes codant pour les transporteurs principaux des sources de carbone gluconéogéniques étant induits par des systèmes à deux composants (Asai *et al*, 2000; Yamamoto *et al*, 2000; Tanaka *et al*, 2003), nous nous sommes demandés si un mécanisme de régulation similaire à celui observé pour *pftAB* était aussi à l'œuvre pour les autres transporteurs.

VI.2.1 Régulations de *dctP*, dépendante et indépendante de CcpA.

Le gène *dctP* code pour le transporteur du succinate et fumarate et est induit par le système à deux composants *dctSR* (Asai *et al*, 2000). Le gène *dctP* se trouve en opéron avec *dctS* et *dctR*. Il existe également un promoteur interne à cet opéron se situant en amont de *dctP* (Asai *et al*, 2000; Nicolas *et al*, 2012) (**Figure 27**). Pour suivre la régulation de *dctP* nous avons utilisé un gène rapporteur, le gène *gfpmut3* codant pour une GFP stable chez *B. subtilis* (Botella *et al*, 2010), placé sous le contrôle de l'un ou l'autre des promoteurs de *dctP*, conduisant à deux constructions différentes : l'une où *gfp* est placé en aval de l'opéron *dctSRP* (la souche BBA0070 avec le plasmide rapporteur *dctp-gfpmut3*), et l'autre où *gfp* est placé en aval de la zone promotrice interne P2_{dctp} (la souche TC37 avec le plasmide rapporteur pBSBP_{dctp}). Ces constructions ont ensuite intégrées au site de l'opéron par simple crossing-over (**Figure 27**).

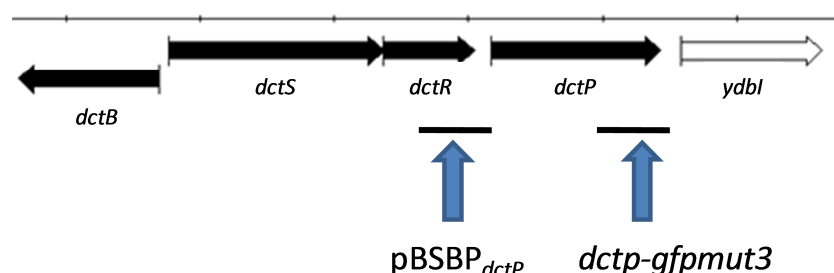


Figure 27. Zones d'insertions des plasmides rapporteurs dans l'opéron *dctSRP*. Sont représentés en flèches épaisses les gènes de *B. subtilis*. En noir les gènes dont la fonction a été étudiée, en blanc le gène de fonction inconnue. Les traits noirs représentent les zones où sont insérés les plasmides rapporteurs (pBSBP_{dctp}, dans le promoteur interne de *dctP* dans l'opéron *dctSRP* et *dctp-gfpmut3* à l'extrémité 3' du gène *dctP*)

A l'aide de ces constructions, la régulation de l'opéron a été testée dans trois milieux différents : un milieu minimum M9 contenant du succinate et du glutamate (M9SE) et n'induisant pas de répression catabolique, un milieu M9SE contenant du glucose et M9SE contenant du malate, ces deux derniers milieux induisant la répression catabolique. Pour vérifier si cette régulation était dépendante de CcpA, les deux constructions rapportrices ont également été intégrées dans une souche où le gène *ccpA* est délété (TC32 et TC38). En comparant ces différentes conditions, on s'aperçoit que dans un milieu M9SE, pour chaque construction, l'expression du gène rapporteur est identique en présence ou en absence de CcpA (**Figure 28**). On observe cependant une différence du niveau d'expression entre les constructions qui pourrait s'expliquer par le fait que l'insertion du gène rapporteur dans la structure de l'opéron pourrait déstabiliser ce dernier et donc entraîner une production plus faible de la GFP. Lorsque du glucose est présent dans le milieu, l'expression des constructions

rapportrices est presque totalement abolie dans les souches avec CcpA. Lorsque *ccpA* est délété, une grande partie de la répression exercée en présence de glucose est levée, indiquant un rôle majoritaire de CcpA pour la régulation de *dctP* dans ces conditions. En revanche, lors d'une croissance dans un milieu M9SE avec du malate, l'expression des gènes rapporteurs est faible même lorsque *ccpA* est délété, montrant qu'il existe une répression indépendante de CcpA exercée sur l'activité de *dctP* en présence de malate.

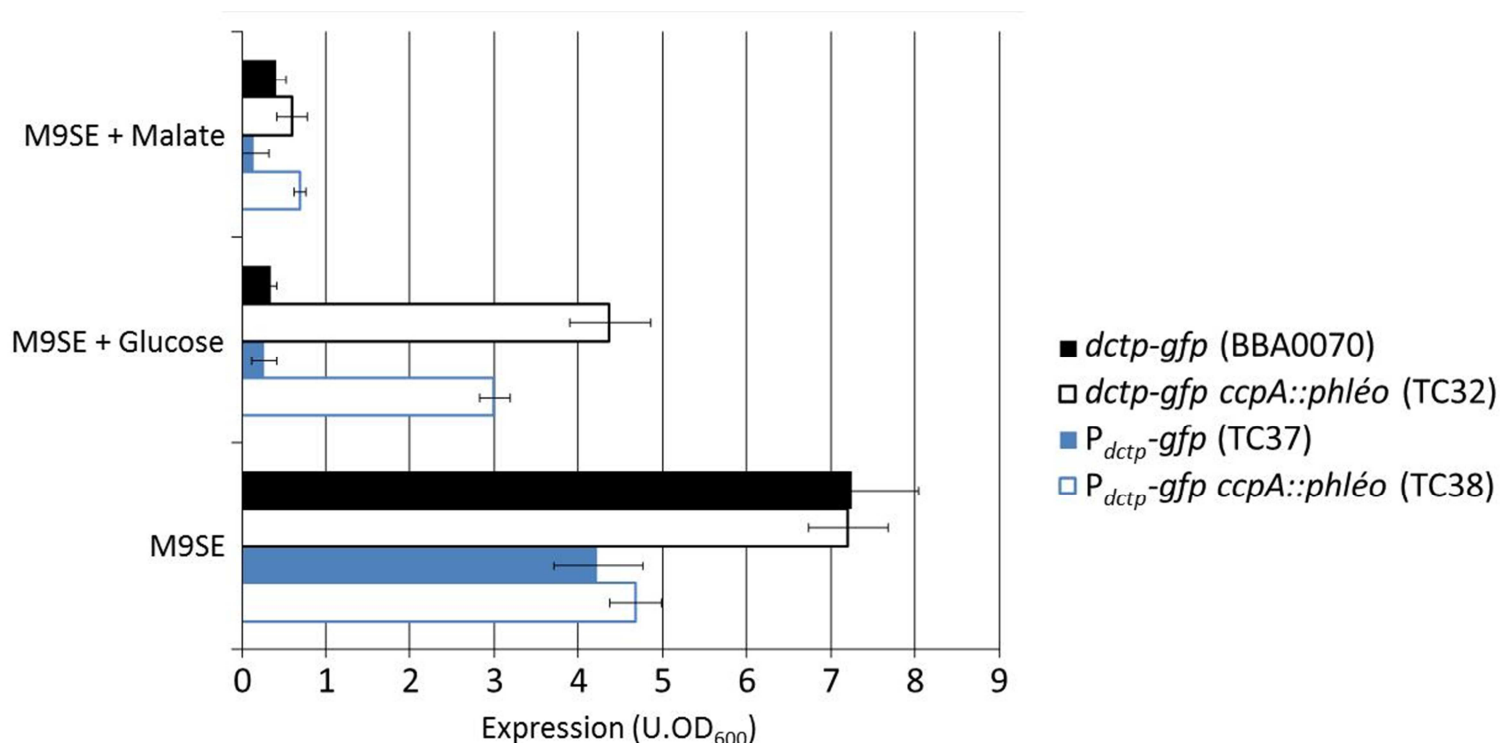


Figure 28. . Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur interne de *dctP* ou de l'opéron *dctSRP*. Les mesures sont faites dans un milieu M9SE + ILMV, M9SE + ILMV + glucose et M9SE + ILMV + malate. Les barres bleues représentent l'expression de la GFP pour les souches où la construction rapportrice a été insérée au niveau du promoteur interne de *dctP*, les barres noires représentent l'insertion en 3' de l'opéron *dctSRP*. Les barres vides indiquent que *ccpA* est inactivé, les pleines que *ccpA* n'est pas muté.

VI.2.2 La régulation de *maeN* en présence de malate

Bien que le malate soit co-métabolisable avec le glucose, il est possible que *maeN*, le gène codant pour le transporteur principal du malate, soit régulé par le glucose au travers de CcpA. En effet, un site de fixation *cre* est prédit en amont de *maeN* (Marciniak *et al*, 2012). J'ai donc testé les effets de CcpA sur ce gène. Pour cela j'ai utilisé une construction rapportrice où le gène *gfpmut3* est placé sous le contrôle de la zone promotrice de *maeN*, que j'ai également introduit dans une souche possédant un gène *ccpA* délété (BBA0032 et TC31). En comparant l'activité du gène rapporteur dans un milieu M9SE avec du malate, et un milieu

M9SE avec du malate et du glucose, on constate que l'expression de la *gfp* est plus forte en absence de glucose, suggérant une régulation par le glucose de *maeN* (**Figure 29**). Lorsque *ccpA* est inactivé, en présence de malate ou en présence de malate et de glucose, l'expression de la *gfp* est plus forte que dans un contexte génétique sauvage (**Figure 29**). Ces résultats indiquent, de manière surprenante, que *maeN* est aussi soumis à une répression catabolique par le glucose *via* CcpA. De manière plus inattendue encore, le malate semble aussi limiter l'expression de son propre transporteur *via* CcpA comme l'indique l'expression augmentée d'un facteur 2 dans un contexte *ccpA*.

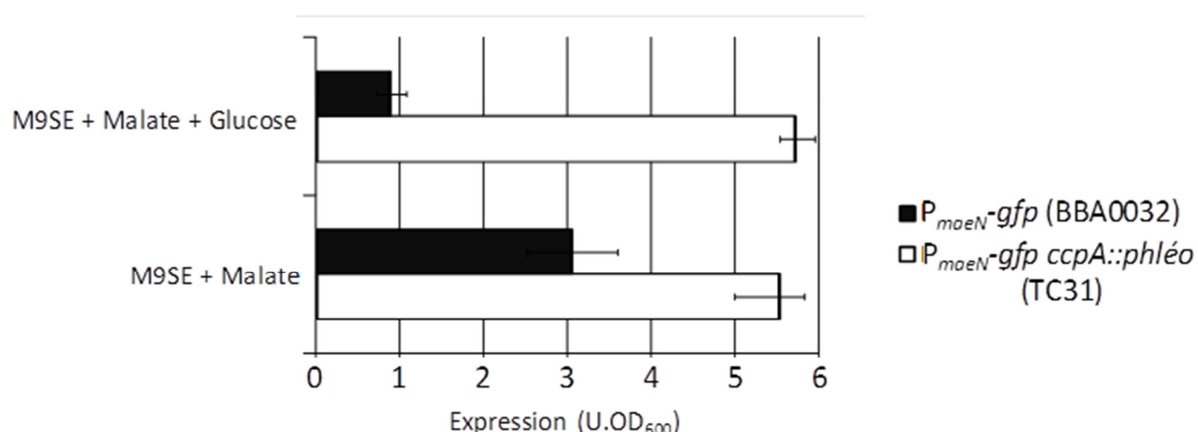


Figure 29. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur de *maeN*. Les mesures sont faites dans deux milieux, un milieu M9SE + ILMV + malate et un milieu M9SE + ILMV + malate + glucose. L'expression de la GFP est mesurée sous le contrôle du promoteur de *maeN* en présence ou absence de CcpA (respectivement barres pleines et barres vides).

VII Régulation de l'entrée des sources de carbone glycolitiques par le malate.

VII.1 Introduction

Pour croître et se développer dans un milieu donné de manière compétitive, une espèce bactérienne doit être capable d'utiliser efficacement les ressources présentes. Parmi ces ressources, les sources de carbone sont particulièrement importantes. Elles permettent en effet de fabriquer les précurseurs indispensables pour le développement de la cellule, et sont également la source principale d'énergie. L'utilisation des sources de carbone est strictement régulée selon une hiérarchie permettant l'utilisation prioritaire des sources les plus rapidement métabolisables par la cellule ce qui permet de concurrencer efficacement les autres bactéries présentes lors de la colonisation d'une niche. En effet, utiliser d'abord ces sources de carbone permet de croître plus rapidement que les autres bactéries et oblige également ces dernières à utiliser des sources de carbone moins efficaces. *B. subtilis* utilise le glucose mais aussi le malate comme source de carbone prioritaire.

Ainsi, comme pour le glucose, le malate est capable de réprimer l'entrée des sources de carbone glycolitiques au travers de CcpA (Meyer *et al*, 2011b). Cependant, le mécanisme qui permet cette régulation n'est pas connu. C'est ce dernier que je me propose d'étudier au cours de cette deuxième partie.

VII.2 Résultats

Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la répression des sources glycolitiques par le malate : il existerait un mécanisme d'activation spécifique à l'utilisation du malate impliquant une ou plusieurs enzymes, ou le flux métabolique en présence de malate conduit à une augmentation suffisante de FBP et d'ATP pour l'activation canonique de la répression par CcpA. Pour distinguer ces deux hypothèses, nous avons étudié l'impact des enzymes impliquées dans le métabolisme du malate sur la répression catabolique par le malate *via* CcpA.

VII.2.1 Rôle du système à deux composants malK/R

Nous avons tout d'abord étudié l'implication du système à deux composants MalK/R, responsable de l'induction du gène codant pour le transporteur principal de malate *maeN* et d'une des enzymes maliques, dans la régulation. Pour cela, j'ai testé l'effet de la délétion du gène codant pour le senseur *malK* sur l'activité d'un promoteur $P_{bgIP\Delta RAT}$ (le promoteur de

l'opéron *bglPH* modifié afin que son activité soit rendue indépendante de son inducteur naturel, les β -glucosides) sensible à la répression par CcpA (TC19). Pour suivre l'activité de ce promoteur, j'ai utilisé le gène *gfpmut3* comme gène rapporteur, puis intégré cette construction au site du promoteur P_{bglP} par simple crossing-over.

Dans les milieux M9SE, et M9SE + glucose, on ne constate pas d'effet de la délétion de *malK* sur l'expression du gène rapporteur. En revanche, dans le milieu M9SE contenant du malate on observe que la répression du gène rapporteur est totalement levée (**Figure 30**). Dans cette condition, le gène *maeN* n'est pas exprimé, empêchant l'entrée du malate dans la cellule. La bactérie se trouve donc dans des conditions métaboliques similaires à celles rencontrées dans un milieu M9SE. Cela montre que l'entrée du malate dans la cellule est nécessaire pour activer la répression catabolique par CcpA et que le système Malk/R est le seul senseur responsable de cette répression.

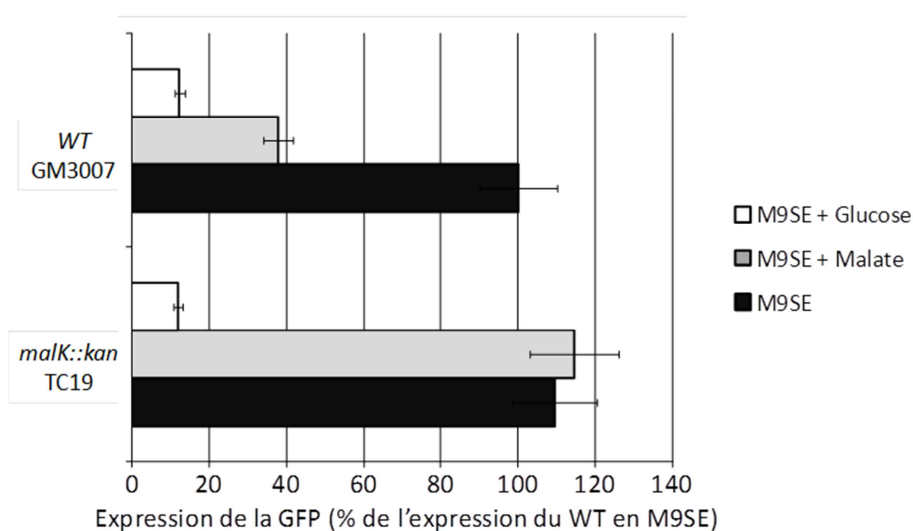


Figure 30. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bglPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans un mutant du système à deux composants Malk/R. L'axe des ordonnées indique le génotype des souches étudiées. Les inactivations ont été mesurées dans 3 milieux : M9SE, M9SE + malate et M9SE + glucose. L'expression de la GFP dans chaque condition est exprimée en pourcentage de l'expression de la GFP pour la souche GM3007 (WT) dans le milieu M9SE (pas de répression catabolique par CcpA).

VII.2.2 Rôle des enzymes maliques

L'entrée du malate étant nécessaire pour la régulation par CcpA, nous nous sommes intéressés à l'implication des quatre enzymes maliques dans la régulation. Comme pour *malK/R*, nous avons délété les gènes des différentes enzymes et vérifié l'effet de ces délétions sur la régulation par CcpA.

On constate que pour les enzymes MleA et MalS, deux enzymes NAD(H)-dépendantes, la délétion de leur gène ne permet pas de lever la répression en présence de malate (**Figure 31**). La délétion d'*ytsJ* codant l'enzyme malique NADP(H)-dépendant n'entraîne pas de levée de la répression du gène rapporteur en présence de malate, et semble même permettre une répression légèrement plus importante (**Figure 31**).

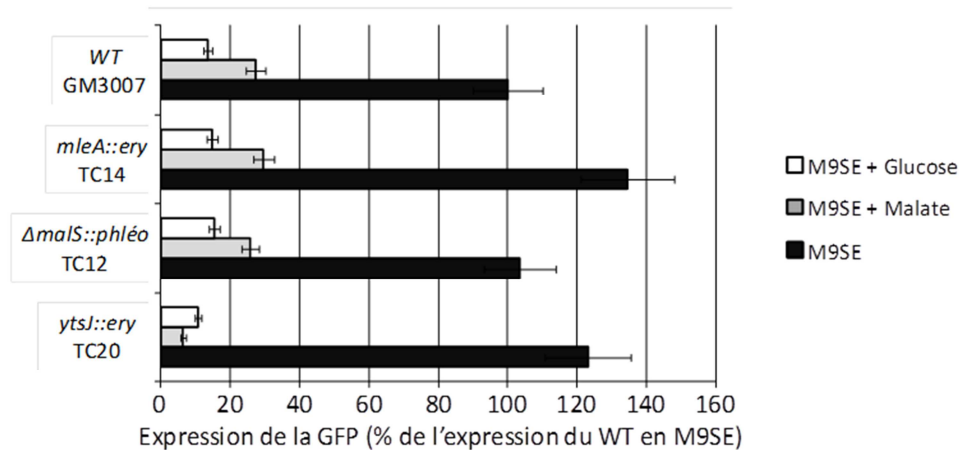


Figure 31. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bglPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans des contextes génétiques mutés pour les gènes *mleA*, *malS* et *ytsJ*. L'axe des ordonnées indique le génotype des souches étudiées. Les inactivations ont été mesurées dans 3 milieux : M9SE, M9SE + malate et M9SE + glucose. L'expression de la GFP dans chaque condition est exprimée en pourcentage de l'expression de la GFP pour la souche GM3007 (WT) dans le milieu M9SE (pas de répression catabolique par CcpA).

L'enzyme malique MaeA (NAD(H)-dépendant) est la seule des quatre enzymes spécifiquement induite en présence de malate via le système à deux composants MalK/R. On peut observer sur la Figure 32, qu'en présence de malate la délétion de *maeA* permet de relever partiellement la répression sur l'expression du gène rapporteur. Le gène *maeA* se trouve en opéron avec le gène de fonction inconnue *ywkB*. Pour vérifier si la levée de la répression obtenue par la délétion de *maeA* n'est pas due à un effet polaire, nous avons également testé la délétion du gène *ywkB*. Cette délétion n'entraîne pas de levée de la répression du gène rapporteur dans un milieu M9SE avec du malate (**Figure 32**), cela montre que *maeA* a un rôle dans la régulation par le malate via CcpA.

Des délétions multiples ont également été réalisées et montrent que seule la délétion de *maeA* entraîne une levée de la répression en présence de malate.

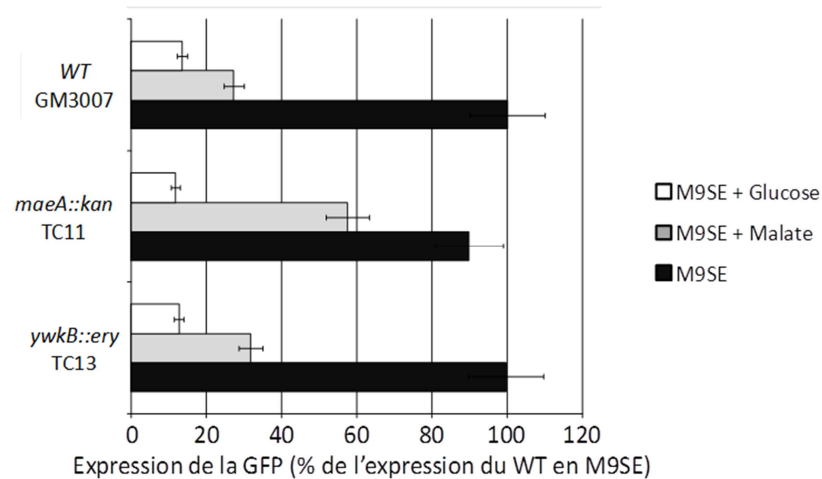


Figure 32. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bgIPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans des contextes génétiques mutés pour l'opéron *maeA*. L'axe des ordonnées indique le génotype des souches étudiées. Les inactivations ont été mesurées dans 3 milieux : M9SE, M9SE + malate et M9SE + glucose. L'expression de la GFP dans chaque condition est exprimée en pourcentage de l'expression de la GFP pour la souche GM3007 (WT) dans le milieu M9SE (pas de répression catabolique par CcpA).

VII.2.3 Le flux métabolique est impliqué dans la régulation par CcpA

Pour distinguer entre nos deux hypothèses de départ, nous avons exprimé *maeA* indépendamment de son induction par le malate. Pour cela, *maeA* a été placé sous le contrôle du promoteur P_{spac} inductible à l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) dans une souche où *malK* est délété, ce qui permet la synthèse de la protéine même en absence de malate. Cette construction a ensuite été testée en présence de 1mM d'IPTG. Dans un milieu M9SE et M9SE avec du glucose, cette construction n'affecte pas l'expression du gène rapporteur. En présence de malate, son expression n'est pas réprimée (**Figure 33**). Cela indique que la présence seule de MaeA n'est pas suffisante pour induire la répression catabolique par le malate à travers CcpA, et qu'ainsi le flux métabolique passant par MaeA est important pour cette régulation.

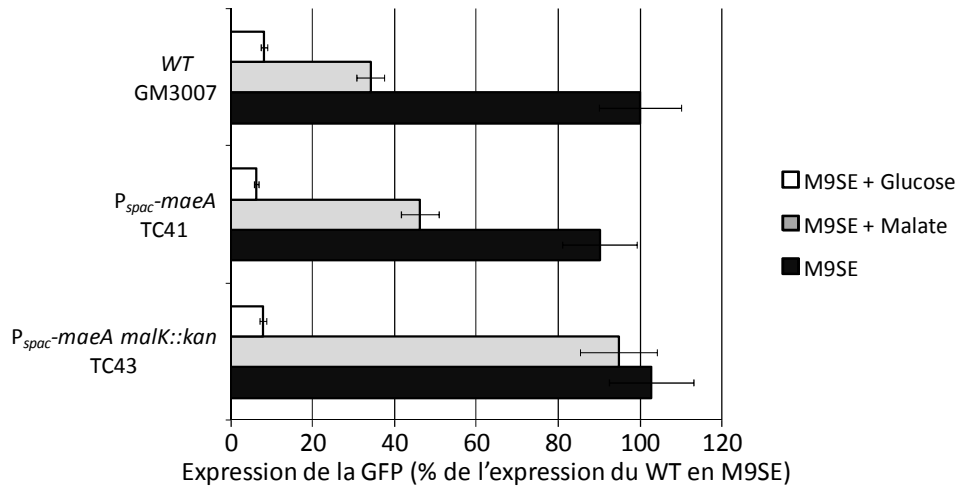


Figure 33. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bgIPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans des conditions de surexpression du gène codant l'enzyme malique MaeA. L'axe des ordonnées indique le génotype des souches étudiées. Les inactivations ont été mesurées dans 3 milieux : M9SE, M9SE + malate et M9SE + glucose dans lesquelles est ajouté de L'IPTG (1nM). L'expression de la GFP dans chaque condition est exprimée en pourcentage de l'expression de la GFP pour la souche GM3007 (WT) dans le milieu M9SE.

Pour vérifier si seul le flux métabolique était nécessaire pour entraîner la répression catabolique par CcpA, la délétion de *maeA* a été complétée par l'expression des autres enzymes maliques. Comme seul *maeA* est spécifiquement induit en présence de malate, pour avoir un flux similaire *malS*, *mleA* et *ytsJ* ont été placés sous le contrôle de P_{hs} , un promoteur inductible à l'IPTG dans une souche où *maeA* est délété. Dans un milieu M9SE avec du malate la répression est rétablie lorsque *malS*, *mleA* ou *ytsJ* sont exprimés (**Figure 34**) indiquant que le flux associé à l'activité des enzymes maliques est le facteur principal de la régulation par le malate à travers CcpA.

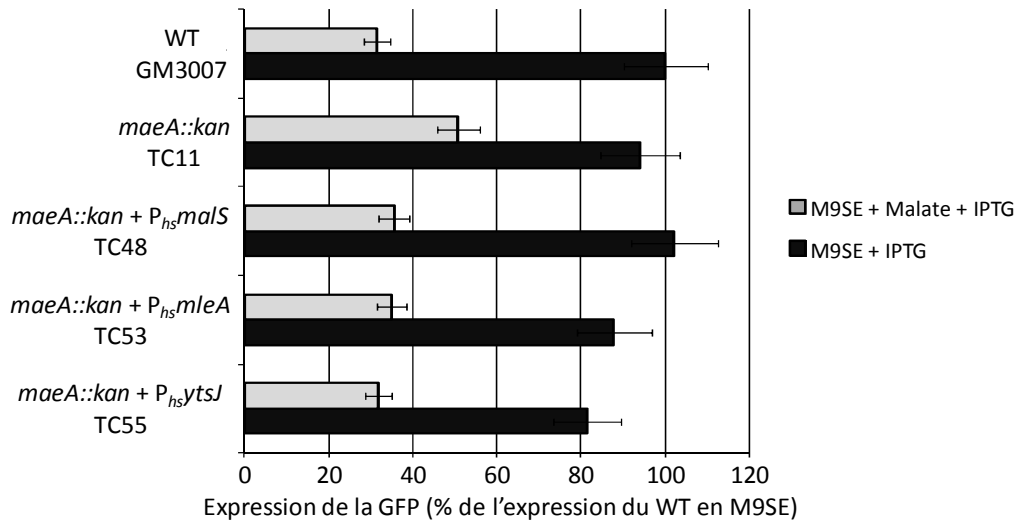


Figure 34. Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur $P_{bgIPARAT-term}$ rapporteur de l'activité de CcpA dans des conditions de surexpression des gènes codant les enzymes maliques MalS, MleA et YtsJ en absence de *MaeA*. L'axe des ordonnées indique le génotype des souches étudiées. Les inactivations ont été mesurées dans 3 milieux : M9SE, M9SE + malate et M9SE + glucose dans lesquelles est ajouté de L'IPTG (1 mM). L'expression de la GFP dans chaque condition est exprimée en pourcentage de l'expression de la GFP pour la souche GM3007 (WT) dans le milieu M9SE.

Discussion et perspectives

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés au transport du pyruvate chez *B. subtilis*, avec la mise en évidence d'un nouveau transporteur ainsi que de sa régulation par un nouveau mécanisme étroitement lié à l'homéostasie du pyruvate. Nous avons également étudié, de façon plus élargie, la régulation de l'entrée des sources de carbone glycolytiques et gluconéogéniques par le malate.

VIII L'opéron *pftAB* code pour un transporteur passif du pyruvate

La plus grande partie de cette thèse a consisté à déterminer la fonction et la régulation de l'opéron *pftAB*. Nous avons ainsi montré, en utilisant des protéines YsbA et PftB étiquetées, qu'elles formaient un complexe hétéro-oligomérique localisé à la membrane. La délétion de cet opéron a également montré qu'il était essentiel à la croissance de *B. subtilis* avec le pyruvate comme seule source de carbone, et ne semble pas être impliqué pour la croissance avec les autres sources de carbone testées (glucose, malate, succinate). Pour vérifier de façon certaine l'implication de *pftAB* dans le transport du pyruvate, nous avons utilisé une souche de la bactérie à Gram positif *C. glutamicum* dont le gène *mctC* (codant le transporteur du pyruvate identifié) a été délété, la rendant incapable de croître avec le pyruvate comme seule source de carbone. La complémentation fonctionnelle hétérologue de cette souche par *pftAB* de *B. subtilis* montre une restauration partielle de la croissance de *C. glutamicum*, indiquant que PftAB est bien directement capable d'assurer le transport du pyruvate (l'hypothèse selon laquelle PftAB activerait chez l'hôte hétérologue *C. glutamicum* un transporteur secondaire du pyruvate, inactif dans le mutant non complémenté peut en effet être raisonnablement considérée comme improbable).

Nous avons également montré, au travers d'expériences biochimiques de mesures de concentrations de pyruvate extracellulaire, que PftAB fonctionnait comme un facilitateur du transport du pyruvate, et qu'il pouvait également être impliqué dans son export. Le fait que PftAB soit un transporteur par diffusion facilitée, pourrait expliquer pourquoi la complémentation fonctionnelle de la souche mutante pour *mctC* de *C. glutamicum* ne permet pas le rétablissement total du phénotype sauvage, même à un fort niveau d'induction de *pftAB*. Le sens de transport du pyruvate par PftAB est déterminé par les concentrations du pyruvate. Si la concentration extracellulaire est supérieure à la concentration intracellulaire, alors le pyruvate entre dans la cellule ; et si la concentration extracellulaire est inférieure à la

concentration intracellulaire, alors le pyruvate sort de la cellule. Nos expériences ont également montré que même en absence de *pftAB*, le pyruvate pouvait toujours être transporté, indiquant l'existence d'au moins un autre transporteur. Cependant, la délétion de *pftAB* entraînant une perte totale de croissance sur pyruvate, ce ou ces transporteurs alternatifs ne sont manifestement pas impliqués dans la croissance sur pyruvate, au moins dans les conditions testées. Enfin, en mesurant les concentrations extracellulaires du glucose, du citrate et de l'acétate, nous avons constaté que PftAB est spécifique au transport du pyruvate. Ainsi, nous avons montré que *pftAB* code pour le transporteur principal du pyruvate. Il est aussi intéressant de constater que l'expression de *pftAB* dans une souche d'*E. coli* entraîne la mort des bactéries, que ce soit dans un milieu riche (LB) ou pauvre (M9) et quelle que soit la source de carbone utilisée. Il semble donc que cet opéron soit létal lorsqu'il est exprimé dans une bactérie à Gram-négatif. Cela peut être dû à sa fonction. En effet, il est possible que chez *E. coli* et les bactéries à Gram-négatif, l'expression même faible de cet opéron entraîne une fuite du pyruvate en dehors de la cellule. Cette fuite empêcherait le fonctionnement normal du métabolisme central du carbone, entraînant la mort de la cellule.

Chez *B. subtilis*, PftA et PftB sont annotées comme une holine et une antiholine, respectivement, et sont homologues à LrgA et LrgB que l'on retrouve chez *Staphylococcus aureus* (**Figure 35**). Les holines et antiholines sont des protéines d'origine virale, dont les gènes se sont intégrés dans le génome d'un grand nombre de bactéries. On en retrouve aussi chez des archées et certains eucaryotes (Saier & Reddy, 2015). Ces protéines se regroupent à la membrane, et lorsqu'elles sont en nombre suffisant, elles créent un pore au sein de la membrane, entraînant la mort de la cellule (Saier & Reddy, 2015). Chez *S. aureus*, LrgA semble avoir ce rôle en se liant à CidA (Sadykov & Bayles, 2012). Il existe aussi chez *B. subtilis* une protéine homologue à CidA (YwbH), mais mes expériences de SPA-TAG avec PftA et PftB n'ont pas permis d'identifier cette protéine parmi celles qui interagissent avec PftA ou PftB. Cependant, il existe des différences entre le mécanisme chez *S. aureus* et *B. subtilis*, en effet LrgA (PftA) ne se lie pas à LrgB (PftB) comme c'est le cas chez *B. subtilis* (**Figure 35, Figure 36A**)

Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine chloroplastique PGG1 possède un domaine LrgB et a été décrite comme étant impliquée dans la mort cellulaire, bien que sa fonction moléculaire n'ait pu être identifiée (Yamaguchi *et al*, 2012; Yang *et al*, 2012). Une étude plus récente de Pick et collaborateurs (2013) montre que PGG1 est impliquée dans le transport du glycolate et du glycérate au travers de la membrane du chloroplaste (Pick *et al*, 2013). Cela

indique que des protéines de la famille des holines, impliquées dans le transport de petits métabolites importants pour la cellule (glycolate, glycérate ou le pyruvate), définissent ainsi une nouvelle classe de transporteurs. La découverte d'autres holines ayant un rôle similaire chez d'autres organismes, permettrait de déterminer si ce type de transporteur est limité à quelques organismes, où si il est plus largement répandu.

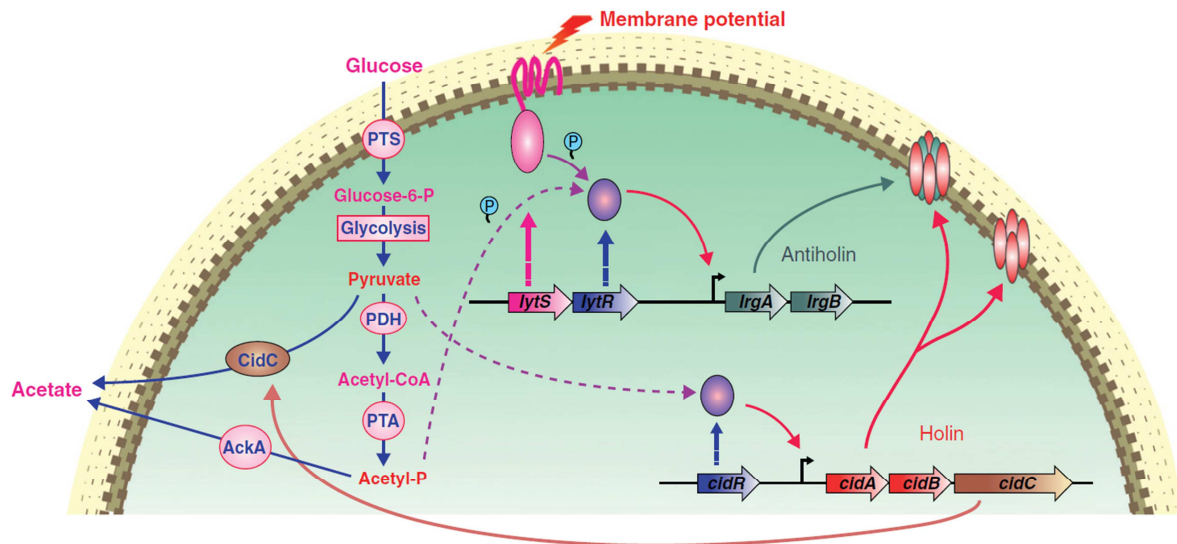


Figure 35. Schéma du système de régulation Cid/Lrg chez *S. aureus*. Les produits des opérons *cidABC* et *lrgAB* sont impliqués dans le contrôle de la mort et de la lyse cellulaire. Les gènes *cidA* et *lrgA* codent pour des protéines hydrophobes homologues, dont on suppose qu'elles fonctionnent respectivement comme des holines et antiholines. Les gènes *cidB* et *lrgB* codent pour des protéines hydrophobes homologues de fonction inconnue. Le gène *cidC* code pour une pyruvate oxydase qui décarboxyle le pyruvate en acétate. Le système à deux composants LytSR sent une décroissance du potentiel de membrane, ce qui induit la transcription de *lrgAB*. Le produit intermédiaire de la voie de l'overflow (représenté sur la gauche), acétyl phosphate (Acétyl-P), est proposé comme activateur de LytR indépendamment de LytS. Le régulateur transcriptionnel de la famille LysR, CidR, induit la transcription de *cidABC* au cours de l'overflow en réponse à l'accumulation de pyruvate ou acétate intracellulaire. Les enzymes du phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransférase system (PTS), du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), la phosphotransacétylase (PTA) et l'acétate kinase (AckA) représentées sur ce schéma, sont impliquées dans le métabolisme de l'overflow. D'après Sadykov & Bayles, 2012.

104

IX Régulation de *pftAB* par le pyruvate

Le pyruvate est un métabolite central dans le métabolisme du carbone mais est également un indicateur de l'état physiologique de la cellule. La régulation de son transport est donc primordiale. En s'appuyant sur le fait que les gènes impliqués dans une même fonction tendent à être liés physiquement sur le génome ainsi que sur la base des travaux de Leyn et collègues (Leyn *et al*, 2013), nous avons vérifié que le système à deux composants *lytST* situé en amont de *pftAB* était responsable de l'induction de ce dernier. Cette organisation chromosomique se retrouve chez de nombreux firmicutes, mais également chez *Pseudomonas sp.* et d'autres bactéries à Gram négatif. Nous avons montré que la délétion de *lytST* entraînait une perte totale de l'expression de *pftAB*, indiquant qu'il en est le seul régulateur positif actif en présence de pyruvate extracellulaire. Nous avons également muté indépendamment les deux boîtes du site putatif de fixation de LytT situé dans la zone promotrice de *pftAB* et dont les séquences TTTTTCATTTC-agccattg-ATTCTGCAACTC ont été prédites comme telles par Leyn et collègues. Toutes les mutations effectuées mènent à une perte de l'expression de *pftAB* démontrant l'implication de ce site dans la régulation de l'expression de cet opéron.

La croissance de *B. subtilis* avec le pyruvate comme seule source de carbone se fait donc par un transport *via* PftAB. L'opéron *pftAB* est lui-même induit par le système à deux composants *lytST*, et cette induction est dépendante de la présence de pyruvate et de l'absence de sources de carbone répressives (**Figure 36A**). Chez *S. aureus*, l'opéron *lrgAB* est également induit par un système à deux composants similaire à *lytST* nommé *lytSR*, dont le signal serait lié à la force proton motrice (Patton *et al*, 2006), et à l'accumulation d'acétate (Rice *et al*, 2005) (**Figure 35**). De plus, il a récemment été montré chez *B. subtilis*, que l'opéron *pftAB* pouvait être induit en présence d'acétate extracellulaire (Chen *et al*, 2015). Nous avons reproduit ces expériences, et nous n'avons observé qu'une faible induction de *pftAB* lors de la phase stationnaire (données non montrées). Ce phénotype pourrait s'expliquer par une inhibition du métabolisme de l'overflow par l'acétate extracellulaire qui entraînerait une baisse dans la production et l'export de l'acétate et aurait pour conséquence une excrétion plus importante du pyruvate au cours de la phase exponentielle de croissance. Au début de la phase stationnaire de croissance, la répression catabolique par CcpA est totalement inactive et le pyruvate exporté peut alors activer LytTS de manière dose dépendante. En effet, l'induction de *pftAB* était plus forte en début de phase stationnaire lors d'une croissance en présence de malate qu'une croissance en présence de glucose, ce qui est cohérent avec le fait qu'une croissance sur malate favorise l'export du pyruvate par rapport à une croissance sur glucose

(Chubukov *et al*, 2013). Chez *Staphylococcus epidermidis*, il existe aussi un système *lyt/lrg* lui aussi impliqué dans la mort cellulaire et la formation de biofilm (Zhu *et al*, 2010) comme pour *S. aureus*. Cette étude montre également que la délétion de *lytSR* perturbe l'utilisation du pyruvate, comme chez *B. subtilis*.

Il est clair que le système *lyt/lrg* se retrouve dans plusieurs organismes, et que sa fonction est liée à la mort cellulaire, la formation de biofilms et le transport du pyruvate. Ces rôles ne sont cependant pas sans relations. En effet, le pyruvate est un marqueur important de l'état physiologique de la cellule et il est connu qu'il est impliqué chez *B. subtilis* dans la régulation de la sporulation (cf II.5.1.1) (Gao *et al*, 2002) et de la division cellulaire (cf. II.5.3) (Monahan *et al*, 2014). Ainsi, la concentration du pyruvate intracellulaire est impliquée dans le choix du devenir de la cellule. La formation d'un biofilm et la mort cellulaire font partie de ces choix, il est donc possible que la concentration du pyruvate ait également un rôle lorsque la cellule va former un biofilm ou entrer dans une phase de mort cellulaire. Cela ferait du pyruvate un acteur central dans la décision du devenir de la cellule. Bien que nous ayons pu observer un léger effet sur la formation de biofilm lorsque *pftAB* est délété (données non montrées), la délétion ou la surexpression de cet opéron ne semble pas avoir d'effet sur la mort cellulaire chez *B. subtilis*,

Pour explorer plus en détail le lien entre mort cellulaire et transport du pyruvate, une première étape pourrait consister à étudier le rôle de YwbH. En suivant le phénotype d'une souche mutante pour le gène *ywbH* lors d'une croissance avec le pyruvate, le malate ou le glucose comme seule source de carbone, et évaluant une éventuelle variation dans la mortalité des cellules, cela nous permettrait de montrer une implication de ce gène. De la même façon, il serait intéressant de déterminer quels pourraient être les rôles de *lrgAB*, *lytSR* et *cidA* lors d'une croissance sur milieu minimum avec le pyruvate comme seule source de carbone chez *S. aureus*.

Nous avons également observé qu'il existait une co-létalité entre *ccpA* et *lytST* lors d'une croissance en milieu minimum, et que celle-ci était probablement due à une carence en un ou plusieurs acide(s) aminé(s). Cependant, il n'existe pas de lien direct connu entre *ccpA* et *lytST*, en dehors de la régulation de *pftAB*. Or, il semble que cette co-létalité ne soit pas liée à *pftAB*. Cela indique que *lytST* pourrait avoir d'autres cibles au sein du génome de *B. subtilis*, même si des analyses bioinformatiques conduites par Leyn *et al* ainsi que moi-même, n'ont pas permis de mettre en évidence un autre site de fixation. Cependant, des expériences de

transcriptomique chez *S. epidermidis* et *S. aureus*, montrent que la délétion de *lytSR* entraîne la modification de l'expression de près de 200 gènes (Zhu *et al*, 2010; Sharma-Kuinkel *et al*, 2009), notamment ceux impliqués dans la biosynthèse d'acides aminés. L'implication de certains acides aminés a pu être exclue, notamment la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la valine, le glutamate et le tryptophane ; cependant, déterminer le(s)quel(s) est (sont) impliqué(s) dans l'absence de croissance des doubles mutants *ccpA/lytST* serait intéressant, et nous permettrait d'orienter des recherches sur une éventuelle nouvelle cible pour *lytST*. Il serait aussi intéressant de vérifier si *ywbH* ne pourrait pas jouer un rôle dans cette co-létalité, et permettre le lien entre *lytST* et *ccpA*. Il est également possible qu'un cross-talk existe entre *lytS* est une autre protéine effectrice, ce qui expliquerait qu'aucune autre cible de LytT ne semble présente chez *B. subtilis*. Une étude transcriptomique des simples et double mutants *LytS/T* en croissance sur M9SE et en présence de pyruvate permettrait probablement de distinguer les deux hypothèses ci-dessus. En combinant ces résultats à une identification de(s) (l')acide(s) aminé(s) essentiel(s) à la croissance du double mutant *ccpA lytST*, nous serions en mesure d'affiner nos hypothèses et de proposer une explication plus générale des phénomènes observés.

X Régulation de *pftAB* par le malate et homéostasie du pyruvate

Comme pour le glucose, la présence de malate dans le milieu est capable d'induire la répression catabolique *via* CcpA (Meyer *et al*, 2011b). Nous avons pu alors vérifier que lors d'une croissance en M9 avec du pyruvate et du malate, l'expression de *pftAB* était réprimée. La délétion du gène *ccpA* ou la mutation de l'un des gènes codant pour ses co-facteurs (*ptsHI*, *crh*) ne permettent pas de lever la répression observée en présence de malate. Il existe donc un mécanisme indépendant de CcpA capable de réprimer *pftAB*. Une mutagenèse aléatoire et un criblage phénotypique nous ont permis de déterminer que le gène *maeA*, codant pour une des quatre enzymes maliques, était nécessaire pour cette régulation, mais pouvait être substitué par la surexpression de chacune des autres enzymes maliques. Cela indique que c'est l'activité de l'enzyme malique, et non la protéine en elle-même, qui est responsable de l'effet observé. Les enzymes maliques, ont pour rôle de catalyser la transformation du malate en pyruvate. Ainsi, lorsque *maeA*, seul gène codant pour une enzyme malique spécifiquement induit en présence de malate (Doan *et al*, 2003), est délété, le flux métabolique permettant de produire du pyruvate à partir de malate est fortement réduit. Cela suggère que la concentration de pyruvate intracellulaire pourrait être impliquée dans l'effet de répression de *pftAB* par le malate (**Figure 36A**). Nous avons testé cette hypothèse en modifiant la concentration

intracellulaire de pyruvate indépendamment de la présence de malate. Nous avons constaté que dans une souche où *pftAB* est délété et où son promoteur contrôle l'expression de la *gfp*, une forte concentration de pyruvate en dehors de la cellule conduit à une forte activité du promoteur de *pftAB*. En revanche, lorsque l'on augmente l'entrée du pyruvate avec une surexpression de *pftAB*, l'expression de la construction rapportrice, et donc l'activité du promoteur de *pftAB*, est plus faible (**Figure 26A**).

Les concentrations intracellulaire et extracellulaire du pyruvate sont donc toutes les deux impliquées dans la régulation de *pftAB*. *B. subtilis* contrôle donc l'homéostasie du pyruvate en jouant sur l'expression de *pftAB* pour ajuster par import ou par export la concentration interne de pyruvate. Le pyruvate étant central pour le métabolisme du carbone, pour la sporulation, avec sans doute un rôle dans la mort cellulaire et dans d'autres processus, il est important de pouvoir réguler strictement son homéostasie. Nous avons ici le premier exemple chez les procaryotes, d'un autocontrôle de l'homéostasie d'un métabolite central à travers la régulation d'un transporteur capable d'import et d'export de ce métabolite.

Bien qu'il semble que les régulations par le pyruvate intracellulaire et extracellulaire passent toutes par le système à deux composants *lytST*, il est important de déterminer par quel mécanisme moléculaire le pyruvate intracellulaire peut agir sur ce système. Ce mécanisme est probablement complexe, et son étude mérite d'être approfondie. De plus, la colétalité qui existe entre *ccpA* et *lytST* montre que ce dernier est probablement impliqué dans au moins une voie de régulation de biosynthèse d'un acide aminé. Des analyses transcriptomiques de souches mutantes pour *lytS* (en cas de phosphorylation de LytT par une autre histidine kinase) ou *lytT* (au cas où LytS pourrait phosphoryler une autre protéine régulatrice) permettraient d'identifier d'autres cibles éventuelles pour ces deux gènes. Enfin, une fois de plus, le mécanisme présent chez *S. aureus* étant très proche de celui de *B. subtilis*, il serait intéressant de montrer qu'il peut s'appliquer aussi chez d'autres organismes, notamment pathogènes.

Il ne faut cependant pas exclure la possibilité d'une régulation qui ne soit pas directement exercée par le pyruvate. En effet, chez *S. aureus*, il a été montré que LytR pouvait être phosphorylé par l'acétyl-phosphate (acétyl-P), qui a été décrit comme pouvant être un phospho-donneur (Wolfe & Wolfe, 2005), même en absence de LytS (Lehman *et al*, 2014). Bien que cette phosphorylation ait un rôle activateur chez *S. aureus*, il est possible que chez *B. subtilis* la phosphorylation par l'acétyl-P entre en compétition avec la phosphorylation par LytS et entraîne une réduction de l'expression de *pftAB*.

XI Un mécanisme similaire pour d'autres sources de carbone ?

La régulation par le malate de l'entrée des sources de carbone gluconéogéniques est complexe. L'ensemble des gènes des transporteurs sont induits par des systèmes à deux composants. Nous avons montré pour le gène *dctP* codant pour le transporteur du succinate et fumarate, qu'il existait une répression indépendante de CcpA en présence de malate. Il est tentant de penser qu'une régulation similaire à celle existant pour *pftAB* puisse exister pour la régulation de *dctP* en présence de malate, et que l'accumulation secondaire d'un métabolite au sein de la cellule soit responsable, *via* l'inhibition du système à deux composants, de l'effet répresseur par le malate. Ainsi, l'accumulation d'un autre métabolite proche du cycle de Krebs comme le succinate, le fumarate, le malate ou l'oxaloacétate qui s'accumule en présence de malate pourrait agir sur DctSR pour limiter l'activation de *dctP*.

J'ai également testé la régulation du transporteur principal du malate MaeN. Bien que le malate soit avec le glucose une source principale de carbone pour *B. subtilis*, il existe bien une répression de *maeN* par le glucose. Elle semble principalement exercée *via* CcpA contrairement à ce qui est observé pour *pftAB* et *dctP*. Il n'est pas pour autant possible d'exclure une régulation indépendante de CcpA. En imaginant une régulation au travers de *malKR* similaire à celle existante pour *pftAB* au travers de *lytST*, il faudrait rendre l'entrée du malate dans la cellule indépendante de l'expression de *maeN* pour pouvoir la détecter. Ainsi, on pourrait placer *maeN* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG, placer la zone promotrice de *maeN* en amont d'un gène rapporteur, dans une souche où le gène *ccpA* est délété. En faisant varier la quantité d'IPTG lors d'une croissance dans un milieu minimum en présence de malate, il serait possible de modifier l'accumulation de métabolite dans la cellule et d'observer une modification de l'expression du gène rapporteur.

Des études ont montré que *citM* (le gène codant le transporteur principal du citrate) était régulé par CcpA en présence de glucose. De façon surprenante, *citM* est également réprimé par le succinate et/ou le glutamate *via* CcpA, bien que cette répression soit faible (Warner *et al*, 2000). Il existe aussi une répression CcpA indépendante de ce gène induit par le métabolisme de l'arginine (Warner *et al*, 2003). Il n'a pas encore été démontré que le malate était capable de réprimer l'expression de *citM* même si une telle répression semble probable. Des expériences avec un gène rapporteur de l'activité de *citM* dans un milieu minimum avec du citrate comme seule source de carbone ou avec du citrate et du malate, en absence ou présence de CcpA indiquerait le rôle du malate et de CcpA dans la régulation de ce gène.

Ce mécanisme de régulation par accumulation d'un métabolite est une régulation par rétrocontrôle. En effet, l'expression forte d'un transporteur peut permettre l'accumulation de la molécule transportée, ou d'une molécule dérivée. En retour, cette molécule va pouvoir agir sur le niveau d'induction du système, soit par un régulateur (comme avec CcpA pour *maeN*), soit par d'autres moyens tel qu'un contrôle du système à deux composants directement responsable de l'induction du gène du transporteur (comme avec *lytST* pour *pftAB*). Cette boucle de rétrocontrôle permet de réguler le métabolisme en évitant un emballement incontrôlé. Cette régulation n'exclut pas pour autant la présence d'(une) autre(s) régulation(s). Comme nous avons pu l'observer pour *pftAB* (**Figure 26C**), lorsque ce rétrocontrôle est supprimé, la répression catabolique *via* CcpA est présente. Cependant, un rétrocontrôle indépendant de CcpA est plus efficace pour la régulation des transporteurs des sources de carbone gluconéogéniques. En effet, la répression par CcpA nécessite l'accumulation de FBP, ce qui est difficile lors d'une croissance avec une source de carbone gluconéogénique (en dehors du malate chez *B. subtilis*). Pour éviter un emballement du métabolisme, il faut que l'accumulation soit détectée et « agisse » rapidement, ce qui privilégie plutôt un métabolite « proche » de celui transporté.

XII Régulation des sources de carbone glycolytiques par le malate

Chez *B. subtilis*, la répression de l'entrée des sources de carbone glycolytiques exercée par le glucose et le malate se fait *via* CcpA. Alors que le mécanisme d'activation de cette répression est connu pour le glucose, il ne l'est pas pour le malate. Nous avons voulu déterminer si ce mécanisme était spécifique du malate, ou plus globalement du flux métabolique issu de ce composé.

L'inactivation de MalK/R, entraîne une levée de la répression par le malate, indiquant que ce système à deux composants est le seul mécanisme de détection du malate extracellulaire impliqué dans cette régulation. De plus, cette inactivation bloque l'entrée du malate dans la cellule, en empêchant l'activation de l'expression de *maeN* au travers MalK/R. Ainsi, le flux métabolique conduisant du malate au pyruvate est considérablement réduit.

Parmi les quatre enzymes maliques que possède *B. subtilis*, trois (MleA, MalS et YtsJ) sont exprimées à des niveaux semblables en présence de glucose ou de malate (Doan *et al*, 2003; Lerondel *et al*, 2006). Ainsi, il n'est pas étonnant de constater que *mleA* et *malS* n'ont pas de rôle dans la répression catabolique *via* CcpA par le malate. Le faible taux de transcription de ces deux gènes en milieu complémenté avec du malate ou du glucose suggère

qu'ils sont exprimés et utiles dans des conditions très particulières (Lerondel *et al*, 2006). YtsJ n'est également pas impliquée dans la répression catabolique, et elle semble au contraire atténuer cette répression. YtsJ est la seule enzyme malique capable de réduire le NADP^+ en NADPH, les autres réduisant le NAD^+ en NADH (Doan *et al*, 2003). Lors d'une croissance avec des sources glycolytiques, une partie importante du flux métabolique passe par la voie des pentoses phosphates ce qui permet notamment de fournir une grande partie du NADPH nécessaire pour la cellule (Meyer *et al*, 2011b). En croissance gluconéogénique, la quantité de métabolites atteignant la voie des pentoses phosphates est faible, ainsi le rôle d'YtsJ devient important pour la réduction du NADP^+ . Son inactivation pourrait provoquer un déséquilibre dans la quantité de NADPH disponible dans la cellule, et ainsi entraîner des effets pléiotropes pouvant expliquer l'effet observé sur la répression catabolique, comme le montre le fort défaut de croissance d'un mutant *ytsJ*.

La quatrième enzyme malique, MaeA est la seule dont le gène est spécifiquement induit par le malate extracellulaire *via* le système à deux composants MalK/R. Bien que son expression soit liée à la présence de malate, la délétion de *maeA* n'entraîne pas de défaut de croissance avec le malate comme source de carbone, son rôle n'est donc pas lié à la croissance. L'inactivation de *maeA* montre qu'en présence de malate, la répression catabolique par CcpA est partiellement levée. MaeA est donc en partie responsable de la répression catabolique par le malate. Aucune synergie n'a été constatée avec les autres enzymes maliques : MaeA a bien un rôle spécifique dans ce mécanisme de répression. De plus, *maeA* se trouve en opéron avec un gène de fonction inconnu (*ywkB*) qui ne semble cependant pas impliqué dans la répression catabolique. L'action de MaeA lors de la répression catabolique est soit liée au flux métabolique passant au travers cette enzyme, soit liée à une activité spécifique de MaeA indépendante de son activité enzyme malique. Dans une souche où MaeA est synthétisée mais où le flux est bloqué, la répression catabolique est levée. De plus, lorsque la délétion de *maeA* est complétée par la surexpression d'une des trois autres enzymes maliques, la répression est restaurée. Cela montre que l'activité enzyme malique et son flux associé sont responsables de la régulation de l'entrée des sources glycolytique par le malate *via* CcpA.

La phosphorylation de HPr sur sa sérine 46 par l'activité de HPrK/S est primordiale pour la régulation catabolique par CcpA. Cette phosphorylation est dépendante de la concentration d'ATP et de FBP dont le fort taux indique la présence d'une source de carbone permettant une croissance optimale pour la bactérie. L'activité des enzymes maliques est impliquée dans le

maintien de la concentration en ATP de la cellule lors d'une croissance en malate (Meyer & Stülke, 2013). La délétion des gènes des trois enzymes NADH-dépendantes ou d'*ytsJ* entraîne une réduction du pool d'ATP d'un maximum de 20% par rapport à une souche sauvage. Or, la délétion d'*ytsJ* n'entraîne pas de levée de la répression (**Figure 31**). Il semble donc que la concentration en ATP ne soit pas le facteur limitant la répression catabolique lors de la délétion de *maeA*. Le malate est la seule source de carbone gluconéogénique capable de produire une concentration de FBP suffisante pour induire cette régulation, bien que cette concentration soit deux fois plus faible qu'en présence de glucose (Meyer *et al*, 2011b). MaeA ne permet pas d'augmenter directement le flux métabolique vers le FBP. En effet, les enzymes maliques catalysent le passage du malate en pyruvate, cependant chez *B. subtilis*, il n'existe pas d'enzyme catalysant la réaction du pyruvate vers le PEP et donc la voie de la glycolyse. L'accumulation de pyruvate intracellulaire peut cependant avoir un rôle dans l'accumulation de FBP. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase FbaA qui catalyse de façon réversible la conversion du FBP en dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et en glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P) est exprimée constitutivement chez *B. subtilis*, mais son activité est régulée par la concentration en pyruvate (Ujita, 1978). Une forte concentration en pyruvate inhibe la réaction de transformation du FBP vers le DHAP et G3P, ce qui favoriserait l'accumulation de FBP et *in fine* activerait CcpA et la CCR (**Figure 36B**). On ne peut cependant pas exclure le déclenchement, en présence de malate, d'un autre mécanisme activant de manière synergique avec l'augmentation de la concentration de FBP la répression par CcpA. Un pool métabolique pourrait par exemple être augmenté/diminué spécifiquement durant la croissance en malate et interagir positivement avec l'une ou l'autre étape de formation du complexe actif CcpA/HPr-Ser46-P (Crh-ser46-P)/ADN. L'accumulation de FBP en présence de malate peut également se produire par le flux métabolique passant par la conversion de l'oxaloacétate en PEP, et remontant directement la voie de la glycolyse. Ainsi, cette accumulation combinée à l'inhibition de l'activité catalytique de FbaA par le pyruvate permettrait d'induire la répression catabolique.

Pour tester ces hypothèses, il faudrait tout d'abord vérifier *in vitro* le rôle de régulateur allostérique du pyruvate sur FbaA par des mesures d'activité enzymatique en absence ou présence de pyruvate. Si son rôle est avéré, tester différentes concentrations de pyruvate permettrait de déterminer à partir de quelle concentration l'activité de FbaA est altérée. Il pourrait également être intéressant de déterminer le site de fixation du pyruvate sur FbaA afin de mieux comprendre comment celui-ci empêche la réaction catalysée par FbaA. De plus, il

serait intéressant d'augmenter le flux gluconéogénique en absence de malate, et de voir si dans cette situation la répression par CcpA peut être activée. Pour cela, il faudrait parvenir à provoquer un flux métabolique équivalent à celui existant en présence de malate. La surexpression des gènes impliqués dans l'assimilation du succinate et fumarate nous permettrait d'obtenir un tel flux. Si la répression était restaurée, cela indiquerait que le flux métabolique est central à cette régulation. Cependant, cela ne permettrait pas d'exclure le rôle complémentaire d'un métabolite autre que le FBP. Celui-ci ayant un rôle sur la régulation par CcpA grâce à son action sur HprK/H (Deutscher *et al*, 2006), une première étape serait de tester l'effet *in vitro* de l'accumulation de métabolites proches du malate sur l'activité de HprK/H, comme cela a déjà été fait pour de nombreuses autres molécules (Deutscher *et al*, 1985; Ramström *et al*, 2003). Certains métabolites sont également capables de favoriser la liaison de CcpA avec les sites *cre* (Gösseringer *et al*, 1997), une seconde étape serait de vérifier *in vitro*, l'effet de l'accumulation de métabolites proches du malate sur la capacité de CcpA à se lier à l'ADN.

Matériels et méthodes

XIII Matériels et méthodes

XIII.1 Milieux et conditions de croissance.

Les souches d'*E. coli* DH5 α et TG1 ont été utilisées pour la construction des plasmides selon des techniques standard (Sambrook *et al*, 1989). Le milieu Luria Bertani (LB) supplémenté par les antibiotiques adéquats a été utilisé pour la sélection des transformants d'*E. coli*, *C. glutamicum* et *B. subtilis*. Les concentrations d'antibiotiques utilisées étaient les suivantes: ampicilline 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, spectinomycine 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (pour *E. coli*), spectinomycine 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycine 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, érythromycine 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, phléomycine 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, chloramphénicol 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (pour *B. subtilis*) et chloramphénicol 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (pour *C. glutamicum*). Pour les autres expériences, *B. subtilis* est cultivée dans un milieu minimum (M9) (Harwood & Cutting, 1990). Ce milieu se compose d'une solution contenant du $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8.50 g.L^{-1}), KH_2PO_4 (3.00 g.L^{-1}), NH_4Cl (1.00 g.L^{-1}), NaCl (0.50 g.L^{-1}). Le pH est ajusté à 7.0 en utilisant du NaOH, puis la solution est autoclavée 20 minutes à 121°C. Elle est complétée avec du $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.00 mg.L^{-1}), ZnCl_2 (1.70 mg.L^{-1}), CuCl_2 (0.43 mg.L^{-1}), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.60 mg.L^{-1}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.60 mg.L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.47 mg.L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (24.60 mg.L^{-1}) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.35 mg.L^{-1}) et $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.10 mg.L^{-1}). Pour compenser le défaut de croissance d'un mutant où *ccpA* est délété, le milieu est supplémenté avec les acides aminés suivants : isoleucine (25 mg.L^{-1}), leucine (50 mg.L^{-1}), valine (40 mg.L^{-1}), méthionine (20 mg.L^{-1}) et glutamate (4 g.L^{-1}) (Ludwig *et al*, 2002). Le milieu est ensuite supplémenté avec des sources de carbone aux concentrations de 3 g.L^{-1} pour le glucose (G), 5 g.L^{-1} pour le malate (M), 4 g.L^{-1} pour le succinate (S) (ainsi que 4 g.L^{-1} pour le glutamate (E) comme source d'azote pour le SE) et 6 g.L^{-1} pour le pyruvate (P). Pour les transformations de *B. subtilis*, le milieu MG1 est composé de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g.L^{-1}), $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (1 g.L^{-1}), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14 g.L^{-1}) et de KH_2PO_4 (6 g.L^{-1}), de glucose (5 g.L^{-1}), de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (40 mg.L^{-1}), d'hydrolysate de caséine (2.50 mg.L^{-1}) et d'extrait de levure (10 mg.L^{-1}), et le milieu MG2 est composé de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g.L^{-1}), $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (1 g.L^{-1}), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (14 g.L^{-1}) et de KH_2PO_4 (6 g.L^{-1}), de glucose (5 g.L^{-1}), de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 mg.L^{-1}), d'hydrolysate de caséine (1.25 mg.L^{-1}), d'extrait de levure (2.50 mg.L^{-1}) et du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.75 mg.L^{-1}). Pour les expériences de complémentation fonctionnelle dans *C. glutamicum*, les bactéries sont placées dans un milieu minimum MM1 (Jolkver *et al*, 2009)

composé de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 g.L⁻¹), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (5 g.L⁻¹), KH_2PO_4 (2 g.L⁻¹) et K_2HPO_4 (2 g.L⁻¹). Le pH est alors ajusté à 7.0 à l'aide de KOH, puis le milieu est supplémenté avec du MgSO_4 (0.25 g.L⁻¹), du CaCl_2 (0.01 g.L⁻¹), de la biotine (0.2 mg.L⁻¹), du FeSO_4 (10 mg.L⁻¹), du MnSO_4 (10 mg.L⁻¹), du ZnSO_4 (1 mg.L⁻¹), du CuSO_4 (0.2 mg.L⁻¹), NiCl_2 (0.02 mg.L⁻¹), du H_3BO_3 (0.09 mg.L⁻¹), CoCl_2 (0.06 mg.L⁻¹), et du NaMoO_4 (0.009 mg.L⁻¹). Le milieu est ensuite supplémenté avec des sources de carbone aux concentrations de 3 g.L⁻¹ pour le glucose et 6 g.L⁻¹ pour le pyruvate.

XIII.2 Souches bactériennes.

La souche d'*E. coli*, DH5 α a été utilisée comme hôte pour les clonages et la souche de *E. coli* TG1 a été utilisée pour l'amplification des plasmides. Les souches de *E. coli* ont été cultivées sur milieu Luria–Bertani (LB), contenant un antibiotique si nécessaire (ampicilline, 100 mg.L⁻¹ ; chloramphénicol, 15 mg.L⁻¹). Un choc thermique a été utilisé pour la transformation sur des cellules rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium (Sambrook *et al*, 1989).

Les souches de *B. subtilis* utilisées dérivent de la souche BSB168, un dérivé *trp*⁺ (donc prototrophe pour le tryptophane) de la souche 168 (Nicolas *et al*, 2012). Les souches d'inactivation des enzymes maliques ainsi que les souches avec le gène de la *gfp* placé en aval de l'opéron *dctSRP*, ont été obtenues par transformation des souches de *B. subtilis* BSB168 et GM3007 par l'ADN génomique de souches du laboratoire (**Tableau 4**). Les différentes souches de surexpression ont été obtenues par insertion de plasmide par double crossing-over au locus du gène *amyE*. *B. subtilis* a été transformée par de l'ADN chromosomique ou des plasmides en utilisant un protocole standard (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961). Plus en détails, les souches sont placées à agitation à 37°C dans 2ml de milieu MG1 pendant 4h30 (ou 5h pour les souches contenant la délétion du gène *ccpA*). 200 μl de culture sont alors transférés dans 2 ml de MG2 placée à agitation pendant 1h30 (pour les souches contenant la délétion du gène *ccpA*, les acides aminés isoleucine, leucine, valine, méthionine ainsi que du glutamate sont ajoutés). 200 μl de culture sont alors placés en contact de l'ADN et incubés 20 minutes à 37°C avant d'être déposés sur boîte. Les constructions impliquant des plasmides dérivés de pDR111 ou pDG1661 sont insérées par recombinaison homologue au locus du gène *amyE* par double crossing-over, et celles impliquant des plasmides dérivés de pDG1664 au locus du gène *thrB* par double crossing-over également. Pour les transformations avec les

plasmides dérivés de pBSB et pGEM[®]-T Easy, les insertions sont effectuées au locus du gène cible par simple ou double crossing-over respectivement.

XIII.3 Manipulation de l'ADN.

Les produits de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été purifiés avec le kit Wizard SV gel and PCR clean-up System (promega). L'ADN plasmidique a été extrait des bactéries *E. coli* avec le kit Wizard plus SV Minipreps (promega). L'ADN génomique de *B. subtilis* a été extrait avec le kit GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich). Les enzymes de restriction et la ligase du phage T4 (promega) ont été utilisées en suivant les recommandations du fabricant. Les ADN polymérases *Phusion* (Finnzymes) et Q5 high-fidelity (NEB) ont été utilisées pour les réactions PCR en suivant les recommandations du fabricant.

XIII.4 Clonages et constructions de plasmides.

Pour la délétion des gènes *pftA*, *pftB*, *pftAB* et *lytST*, les régions de l'ADN contenant ces gènes ont été amplifiées par PCR en utilisant les couples d'amorces appropriées listées dans le **Tableau 5**. Les produits de PCR ainsi obtenus sont ensuite insérés dans le plasmide pGEM[®]-T Easy Vector comme indiqué par le fabricant. Le gène codant pour la résistance au chloramphénicol du plasmide pDRDG2 a été amplifié par PCR en utilisant des amorces contenant les sites de restriction *ClaI*, *SmaI* ou *XbaI* (**Tableau 5**). Des fragments des opérons *pftAB* et *lytST*, ainsi que des fragments des gènes *pftA* et *pftB* ont été substitués par le gène de résistance au chloramphénicol du plasmide pDRDG2.

La complémentation fonctionnelle de *lytST* a été obtenue en intégrant un fragment de PCR de l'opéron *lytST* dans le plasmide pMUTIN4 avec les sites de restriction *BamHI* et *SacI*, puis le plasmide est intégré dans le génome au locus par simple crossing-over.

La complémentation fonctionnelle de la délétion de *mctC* par l'expression de *pftAB* chez *C. glutamicum* est obtenue par l'insertion d'un fragment de PCR de l'opéron *pftAB* dans le plasmide réplcatif Xmj19 à l'aide des sites de restriction *SmaI* et *PstI*, puis la transformation des souches de *C. glutamicum*.

Les fusions du gène de la *gfp* aux promoteurs de *dctP* et de l'opéron *pftAB* ont été obtenues à partir du vecteur pBaSysBioII (ou pBaSysBioIX, plasmide identique au pBaSysBioII mais contenant un gène de résistance au chloramphénicol à la place du gène de résistance à la spectinomycine) et d'un fragment de PCR (**Figure 37**). Les oligonucléotides utilisés pour amplifier ce fragment ont été conçus pour contenir des extensions possédant le

site de coupure pour l'enzyme de restriction *Sma*I, et les séquences CCGCGGGCTTTCCCAGC (pour le brin sens) et GTTCCTCCTTCCCACC (pour le brin antisens), compatibles avec l'insertion dans le vecteur pBaSysBioII (pBSBII) par la méthode du LIC (Ligation-Independent Cloning) (Botella *et al*, 2010) (**Figure 38**). Les plasmides ainsi construits peuvent alors s'insérer par simple crossing-over au locus du promoteur cloné. Une PCR inverse sur le plasmide pBSBP_{ysbAB} a été effectuée pour substituer la totalité ou une partie du site de fixation de LytT à la zone promotrice de *pftAB* par le site de restriction *Bam*HI. Pour obtenir la construction *P_{hs}P_{ysbAB}-gfp*, le fragment de pBSBP_{ysbAB} contenant la construction *P_{ysbAB}-gfp* a été amplifié par PCR avec des amorces contenant les sites de restriction *Sal*I et *Sph*I. Ces sites ont ensuite été utilisés pour insérer ce fragment en aval du promoteur hyperspank du plasmide pDR111. Le plasmide obtenu est alors inséré au locus du gène *amyE* par double crossing-over.

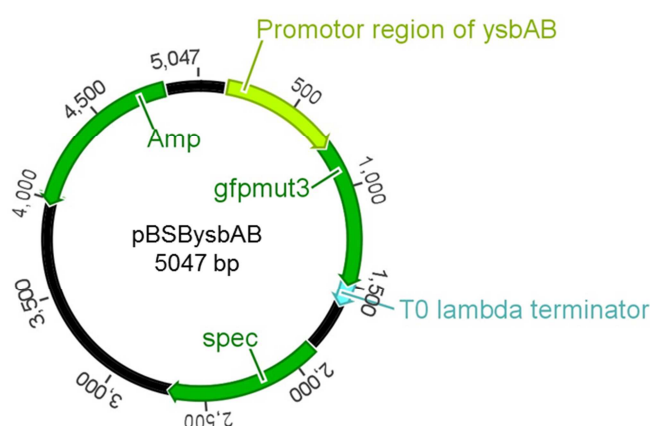


Figure 37. Carte du plasmide pBSBysbAB. Sont représentées en vert foncé les phases ouvertes de lecture des gènes présents sur le plasmide. Avec *Amp* représentant un gène de résistance à l'ampicilline, *spec* représentant un gène de résistance à la spectinomycine et *gfpmut3* représentant le gène de la *gfp* modifié pour une utilisation optimale chez *B. subtilis*. En bleu ciel est représenté le terminateur du phage lambda, et en vert clair est représentée la zone promotrice de l'opéron *pftAB* (~500 pb).

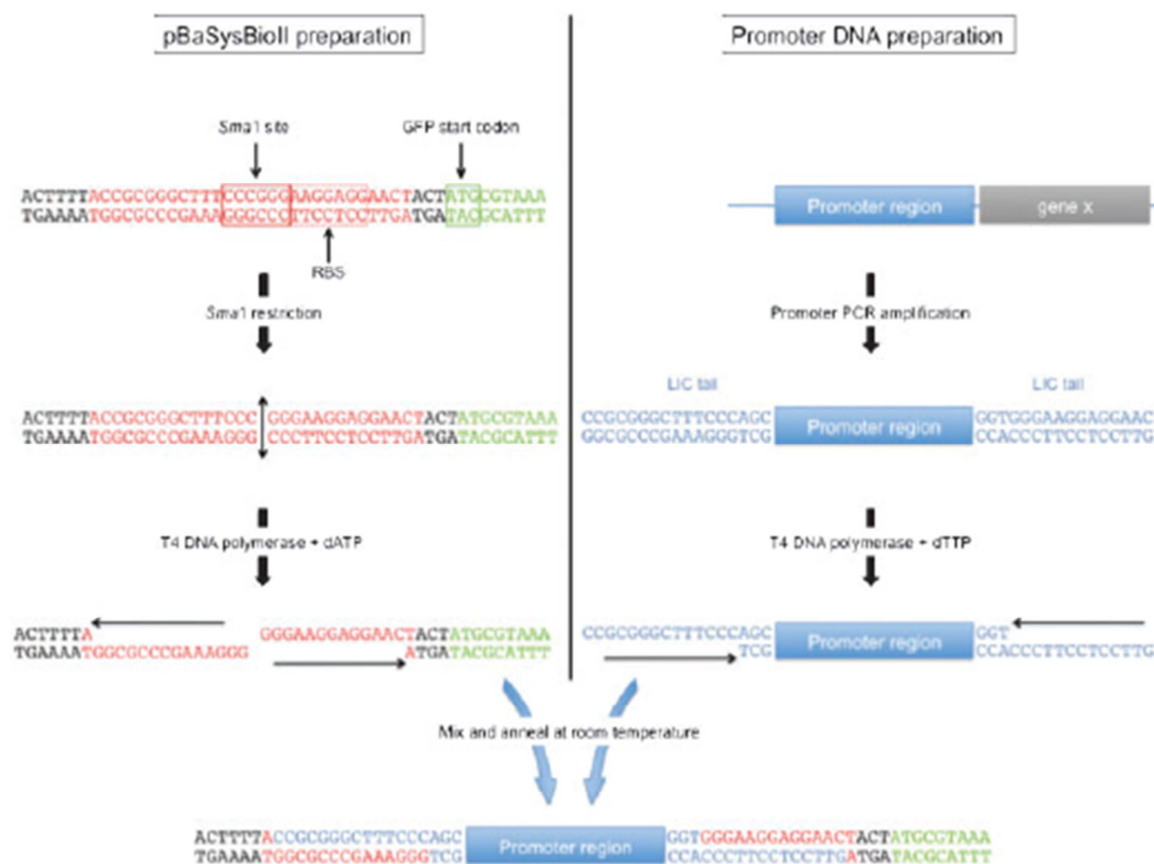


Figure 38. Méthode du LIC (Ligation-Independent Cloning). La digestion du plasmide BaSysBioII par l'enzyme *SmaI* et le traitement par l'ADN polymérase T4 en présence d'ATP génèrent des vecteurs linéaires dont les extrémités 5' sont flottantes (en rouge). Les fragments d'ADN contenant les promoteurs qui vont être utilisés pour le clonage, sont générés par amplification de l'ADN génomique en utilisant des amorces sens et antisens avec une extrémité LIC (en bleu) contenant les séquences complémentaires des séquences LIC obtenues sur le plasmide pBaSysBioII. Les fragments amplifiés par PCR sont alors traité avec l'ADN polymérase T4 en présence de dTTP pour générer des extrémités 5' flottantes parfaitement complémentaires à celles du plasmide. L'hybridation entre les fragments de PCR et le plasmide se fait à température ambiante, et forme un vecteur suffisamment stable pour être introduit directement dans des souches compétentes d'*E. coli*.

La fusion de la région promotrice de *pftAB* en amont du gène *lacZ* a été obtenue à partir du plasmide pDG1661 et d'un fragment de PCR de la région promotrice de *pftAB*. Le fragment a été inséré en utilisant les sites de restriction *HindIII* et *BamHI*. Le plasmide obtenu est alors inséré au locus du gène *amyE* par double crossing-over.

Les souches contenant les gènes *malS*, *ytsJ*, *maeA*, *mleA* et l'opéron *pftAB* sous le contrôle du promoteur P_{hs} (hyperspank) ont été construites à partir des plasmides pDR111 et pDG1664 et de fragments de PCR. Les produits sont digérés par les enzymes de restrictions *SalI* et *SphI* pour *malS*, *ytsJ* et *maeA*, et *SalI* et *NheI* pour *mleA* et l'opéron *pftAB*, puis ligaturés ensemble (**Figure 39**). Les plasmides ainsi obtenus (à l'exception de celui contenant *pftAB*) ainsi que le plasmide pDRDG2 sont alors digérés par les enzymes de restriction *SacI* et

EcoRI afin d'échanger un gène de résistance à la spectinomycine par un gène de résistance au chloramphénicol pour les plasmides pDR111*malS*, pDR111*ysbJ*, pDR111*maeA* et pDR111*mleA*. Pour le transfert de la construction P_{hs} *ysbAB* de pDR111 vers pDG1661, aucun site de restriction adapté n'a pu être identifié, ainsi une PCR inverse sur pDG1661 pour insérer le site de restriction *NotI* a été effectuée. P_{hs} *ysbAB* a alors été cloné dans pDG1661 en utilisant les sites *NotI* et *BamHI*. Les différents plasmides sont ensuite insérés par double crossing-over au locus du gène *amyE* (pDR111) ou *thrB* (pDG1664).

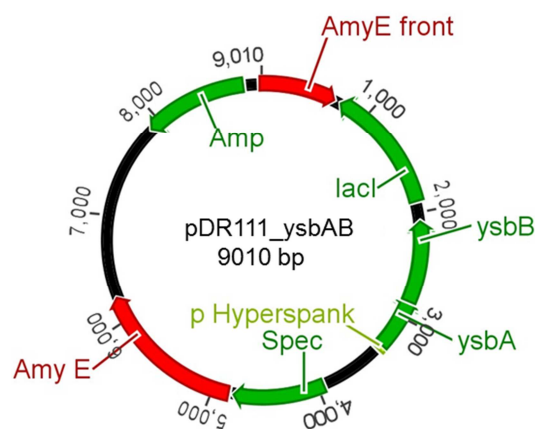


Figure 39. Carte du plasmide pDR111*ysbAB*. Sont représentées en vert les phases ouvertes de lecture, où *Amp* représente un gène de résistance à l'ampicilline, *spec* représente un gène de résistance à la spectinomycine. En rouge sont représentées les zones d'homologie avec le gène *amyE*, et en vert clair le promoteur $P_{hyperspank}$. Le plasmide pDRDG2 a une carte similaire, le gène codant pour la spectinomycine est remplacé par un gène codant pour un gène de résistance au chloramphenicol. Le plasmide pDG1661 a une carte similaire, ses zones d'homologie avec le génome de *B. subtilis* se trouvent au niveau d'un opéron codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de la thréonine.

XIII.5 Mutagénèse aléatoire par transposition.

Le plasmide pIC333 contenant le transposon mini-Tn10 (Steinmetz & Richter, 1994) (**Figure 40**) a été utilisé pour la mutagénèse aléatoire par transposition comme décrit précédemment (Servant *et al*, 2005). pIC333 a été introduit dans la souche TC64 (**Tableau 4**) à une température de 25°C en utilisant la résistance à l'érythromycine pour la sélection. Des colonies transformantes ont été utilisées pour ensemercer 6 cultures indépendantes à 25°C dans 2 ml de LB contenant de la spectinomycine. Au début de la phase exponentielle de croissance, la température est augmentée à 40°C et les cultures poursuivies pendant 4 heures. Elles sont ensuite diluées et étalées sur un milieu minimum M9 solide contenant de la spectinomycine, 0.04% de X-Gal (5_bromo-4-chloro_indolyl-b-D-galactopyranoside), du

pyruvate (6 g.L⁻¹) et du malate (5 g.L⁻¹), et incubées à 25°C pour identifier les clones dont l'expression de la construction rapportrice $P_{ysbAB-lacZ}$ est dérprimée (clones bleus).

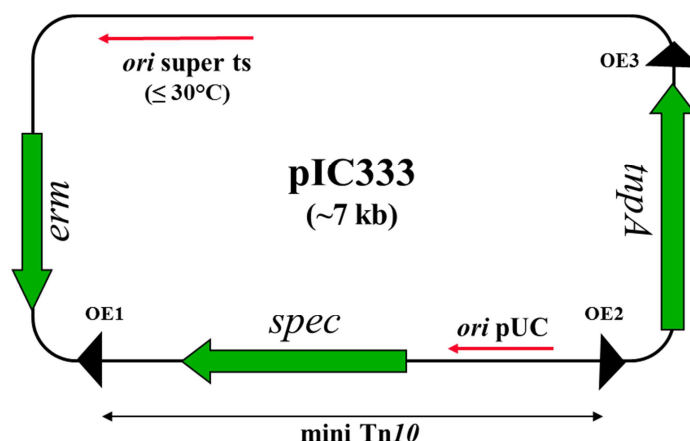


Figure 40. Carte du plasmide pIC333. Sont représentées en flèches vertes pleines les phases ouvertes de lecture, où *erm* représente un gène codant pour une résistance à l'érythromycine, *spec* un gène codant pour une résistance à la spectinomycine et *tnpA* le gène codant pour la transposase du mini-Tn10. Les flèches rouges représentent les deux origines de réplication du plasmide, où *ori super ts* représente l'origine de réplication thermosensible et *ori pUC* une origine de réplication pUC. Les triangles noirs représentent les zones répétées terminales inversées. La double flèche noire représente le mini-Tn10 qui est transféré dans le génome.

XIII.6 Expérience en Live Cell Array.

Les expériences en Live Cell Array ont été effectuées en suivant un protocole préétabli (Buescher *et al*, 2012). Les cellules ont été mises en croissance dans 100 µl de milieu dans une plaque 96 puits (CELLSTAR®, Greiner bio-one) puis incubées avec une agitation continue à 37°C dans un lecteur de microplaques Synergy™ II multimode microplate reader (Biotek) pour une durée d'un minimum de 20 heures (**Figure 41**). La DO_{600} ainsi que la fluorescence (longueur d'onde d'excitation 485/20 nm, longueur d'onde d'émission 528/20 nm) ont été mesurées toutes les 10 minutes pendant cette période. Les DO_{900} et DO_{977} ont été mesurées en début de chaque expérience pour normaliser la longueur du trajet optique pour chaque échantillon à 1 cm en utilisant l'équation suivante : $(DO_{977} - DO_{900}) / 0.18$. La concentration de la GFP est estimée en fonction de la DO_{600} , $(\frac{GFP}{OD})$, lors de chaque mesure. Lors de la phase exponentielle de croissance ($\mu = \text{constant}$), $(\frac{GFP}{OD})$ est constante. De la fluorescéine a été ajoutée pour chaque mesure en deux concentrations (1 et 10 nM) et dupliquées pour pouvoir normaliser la fluorescence en unité équivalente à une concentration de fluorescéine, ainsi la concentration de GFP est exprimée en unité par DO_{600} (une unité étant

équivalente à 1 pM de fluorescéine). Les résultats obtenus ont ensuite été traités par un programme informatique conçu au laboratoire.

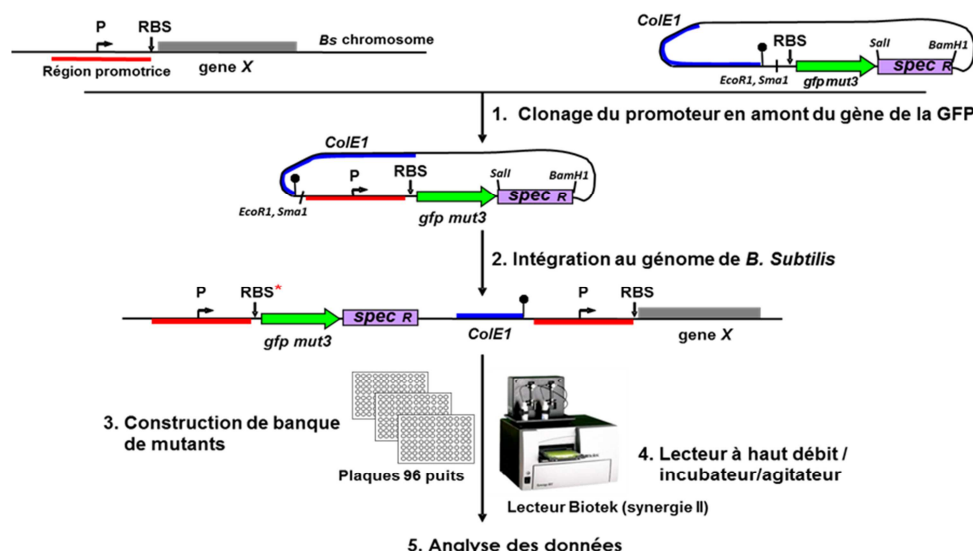


Figure 41. Méthodologie du LCA (Live Cell Array). Cette méthode permet de suivre l'activité d'un promoteur. Il est placé dans un plasmide en amont du gène de la *GFP* (1), puis intégré au génome de *B. subtilis* (2). Il est ensuite placé dans des plaques 96 puits. La fluorescence et le taux de croissance des bactéries (avec la densité optique (DO) à 600nm) sont mesurés par un lecteur Biotek, puis les données sont analysées par ordinateur. En rouge est représenté le promoteur étudié, en bleu l'origine de réplcation de *E. coli*, en vert le gène de la *GFP* et en pourpre le gène de résistance à la spectinomycine. P, promoteur ; RBS, Ribosome Binding Site.

XIII.7 Expérience en TAP-Tag.

La technique de purification par affinité en tandem (TAP-tag) a été développée pour étudier les interactions protéine-protéine, ainsi nous avons utilisé la souche exprimant YsbA-SPA pour effectuer une telle étude. L'étiquette utilisée contient deux domaines d'affinité comprenant un peptide de liaison à la calmoduline et un FLAG. Chaque souche contenant une étiquette est mise en culture pendant la nuit à 37°C dans un milieu LB contenant de l'érythromycine. Les cultures sont alors diluées 400 fois dans du milieu LB sans antibiotique jusqu'à une DO_{600} de 0.4-0.5. Elles sont ensuite diluées à une DO_{600} de 0.001 dans 2 litres de milieu minimum M9 contenant du succinate, du glutamate et du pyruvate comme sources de carbone et incubées à 37°C avec une agitation constante. Lorsque la DO_{600} atteint 0.3, les cultures sont centrifugées à 3000g à 4°C pendant 10 minutes. Les culots ainsi obtenus sont re-suspendus dans 50ml de tampon froid (Tris 10mM, NaCl 15mM, pH 8) et immédiatement plongés dans de l'azote liquide. Les culots sont ensuite décongelés et re-suspendus dans 10ml de tampon H (Hepes 20mM, NaCl 200mM, pH 8) contenant 1mM EDTA. Les cellules sont alors cassées mécaniquement avec une presse de French puis la

phase membranaire est séparée de la phase cytosolique par ultracentrifugation (1h à 100000g). Les culots sont re-suspendus dans du tampon H additionné de 1% DDM (*n*-Dodecyl β -D-maltoside) et CaCl_2 2mM puis déposés sur une colonne contenant des billes à la calmoduline à agitation au froid pendant la nuit. Le lendemain, les colonnes sont éluées et les éluats transférés sur des colonnes contenant des anticorps anti-FLAG à agitation au froid pendant 5 heures. Les colonnes sont éluées dans une solution de glycine (0.1M). Les échantillons sont alors analysés par western-blot et spectrométrie de masse.

XIII.8 Mesure des concentrations des métabolites extracellulaires.

Les souches à tester sont placées la nuit à 37°C avec agitation dans un milieu M9 contenant du glucose. Les cultures sont ensuite diluées dans un milieu M9 contenant du glucose, de l'IPTG et du pyruvate si nécessaire, jusqu'à une DO_{600} de 0.001, puis sont placées à agitation à 37°C. Pour chaque point, 1ml de milieu est centrifugé 5 minutes à 3000 g, et le surnageant est immédiatement congelé à -20°C pour conservation. Les concentrations des produits contenus dans le surnageant sont mesurées par HPLC (High-performance liquid chromatography) en utilisant une Dionex UltiMate® 3000 RSLC systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, massachusetts, USA) calibrée avec des échantillons standard. Les sucres sont détectés avec un détecteur à indice de réfraction, et les acides organiques avec un détecteur UV à une longueur d'onde de 210 nm (**Figure 42**). Seules les concentrations du glucose, du pyruvate, de l'acide citrique et de l'acide acétique ont été analysées. La quantité de substrats ou de produits est calculée par régression linéaire de la concentration extracellulaire en fonction de la biomasse. Au moins 10 points de la phase exponentielle de croissance ont été utilisés pour l'analyse par régression linéaire.

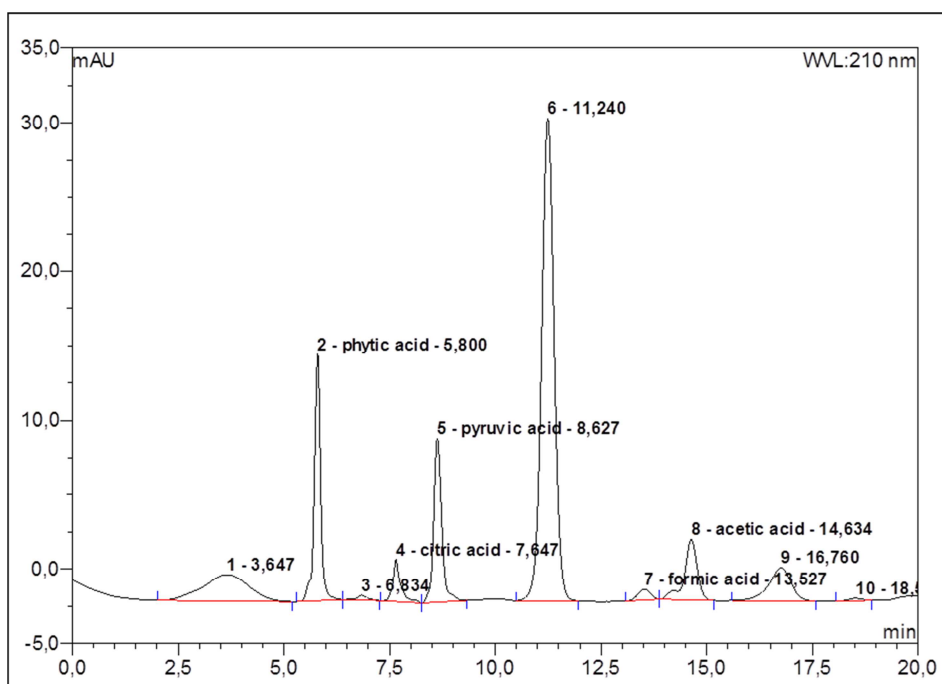


Figure 42. Exemple de chromatogramme obtenu pour les acides. Exemple de la souche TC60 (*ΔysbAB*) dans une culture en M9 plus glucose, sans pyruvate. Echantillon pris après 7h30 de culture. Avec en abscisse le temps de rétention en minute, et en ordonnée la concentration de chaque produit en unité arbitraire.

1 **Tableau 4. Liste des souches de *B. subtilis* (Bs) et de *C. glutamicum* (Cg) utilisées au cours de ce travail**

Souche	Génotype	Source ^a
Bs, BSB168	Wild type	(6, 11)
Bs, GTD131	<i>malK::pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::aphA3</i>	Souche du laboratoire
Bs, GM1606	<i>P_{spac}-maeA/erm</i>	Souche du laboratoire
Bs, GM1644	<i>mleA::pMUTIN (erm)</i>	Souche du laboratoire
Bs, GM2924	<i>Δcrh::aphA3</i>	(1)
Bs, GM2933	<i>ptsH1~cat</i>	(1)
Bs, GM1619	<i>ΔmalS::phleo ytsJ::pMUTIN2 (erm) maeA::aphA3 trpC2</i>	Souche du laboratoire
Bs, GM2907	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo</i>	Souche du laboratoire
Bs, GM1626	<i>ywkB::pMUTIN (erm) trpC2</i>	Souche du laboratoire
Bs, GM3007	<i>P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	Souche du laboratoire
Bs, BBA0032	<i>P_{maeN}-gfpmut3/spec</i>	Souche du laboratoire
Bs, BBA0070	<i>dctp-gfpmut3/spec</i>	Souche du laboratoire
Bs, TC01	<i>maeA::aphA3</i>	GM1619 → BSB168
Bs, TC02	<i>ΔmalS::phléo</i>	GM1619 → BSB168
Bs, TC03	<i>ywkB::pMUTIN2 (erm)</i>	GM1626 → BSB168
Bs, TC04	<i>mleA::pMUTIN (erm)</i>	GM1644 → BSB168
Bs, TC05	<i>ΔmalS::phléo maeA::aphA3</i>	TC01 → TC02
Bs, TC06	<i>maeA::aphA3 mleA::pMUTIN (erm)</i>	TC04 → TC01
Bs, TC07	<i>mleA::pMUTIN (erm) ΔmalS::phléo</i>	TC04 → TC02
Bs, TC08	<i>malS::phléo maeA::kan mleA::pMUTIN (ery)</i>	TC02 → TC06
Bs, TC09	<i>malK::pMUTIN2 Δ(lacZ-erm)::aphA3</i>	GTD131 → BSB168
Bs, TC10	<i>ytsj::pMUTIN2 (erm)</i>	GM1619 → BSB168
Bs, TC11	<i>maeA::aphA3 P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	GM1619 → GM3007
Bs, TC12	<i>ΔmalS::phléo P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	GM1619 → GM3007
Bs, TC13	<i>ywkB::pMUTIN (erm) P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	GM1626 → GM3007
Bs, TC14	<i>mleA::pMUTIN (erm) P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	GM1644 → GM3007
Bs, TC15	<i>ΔmalS::phléo maeA::aphA3 P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	TC02 → TC11
Bs, TC16	<i>maeA::aphA3 mleA::pMUTIN (erm) P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	TC04 → TC11

Souche	Génotype	Source ^a
<i>Bs</i> , TC17	<i>mleA::pMUTIN (erm) ΔmalS::phléo P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	TC04 → TC12
<i>Bs</i> , TC18	<i>ΔmalS::phléo maeA::aphA3 mleA::pMUTIN (erm) P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	TC01 → TC17
<i>Bs</i> , TC19	<i>malK::pMUTIN2 Δ(lacZ-erm)::aphA3 P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	GTD131 → GM3007
<i>Bs</i> , TC20	<i>ytsj::pMUTIN2 (erm) P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	GM1619 → GM3007
<i>Bs</i> , TC28	<i>maeA::aphA3 P_{hs}malS/cm</i>	pDR111_ <i>malS</i> → TC01
<i>Bs</i> , TC29	<i>P_{hs}malS/cm</i>	pDR111_ <i>malS</i> → BSB168
<i>Bs</i> , TC31	<i>P_{maeN}-gfpmut3/spec ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phléo</i>	BBA0032 → GM2907
<i>Bs</i> , TC32	<i>dctp-gfpmut3/spec ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phléo</i>	BBA0070 → GM2907
<i>Bs</i> , TC35	<i>P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pBSBP _{ysbAB} → BSB168
<i>Bs</i> , TC36	<i>ccpA::Tn617Δ(term lacZ)::phleo P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pBSBP _{ysbAB} → GM2907
<i>Bs</i> , TC37	<i>P_{dctp}-gfpmut3/spec</i>	pBSBP _{dctp} → BSB168
<i>Bs</i> , TC38	<i>P_{dctp}-gfpmut3/spec ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phléo</i>	pBSBP _{dctp} → GM2907
<i>Bs</i> , TC40	<i>P_{spac}-maeA/erm</i>	GM1606 → BSB168
<i>Bs</i> , TC41	<i>P_{spac}-maeA/erm P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	GM1606 → GM3007
<i>Bs</i> , TC42	<i>P_{spac}-maeA/ery malK::pMUTIN2 Δ(lacZ-erm)::aphA3</i>	GM1606 → TC09
<i>Bs</i> , TC43	<i>P_{spac}-maeA/ery malK::pMUTIN2 Δ(lacZ-erm)::aphA3 P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	GM1606 → TC19
<i>Bs</i> , TC48	<i>maeA::aphA3 P_{hs}MalS(cm) P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec</i>	pDR111 <i>MalS</i> → TC11
<i>Bs</i> , TC52	<i>maeA::aphA3 mleA::pMUTIN (erm) P_{hs}mleA (cm)</i>	pDR111 <i>mleA</i> → TC06
<i>Bs</i> , TC53	<i>maeA::aphA3 mleA::pMUTIN (erm) P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec P_{hs}mleA (cm)</i>	pDR111 <i>mleA</i> → TC16
<i>Bs</i> , TC54	<i>maeA::aphA3 ytsj::pMUTIN2 (erm) P_{hs}ytsJ (cm)</i>	pDR111 <i>ytsJ</i> → TC21
<i>Bs</i> , TC55	<i>maeA::aphA3 ytsj::pMUTIN2 (erm) P_{bglpΔtermRAT}-gfpmut3/spec P_{hs}ytsJ (cm)</i>	pDR111 <i>ytsJ</i> → TC22
<i>Bs</i> , TC58	<i>ΔlytST::cm</i>	pGEMTeasy_ <i>lytST::cm</i> → BSB168
<i>Bs</i> , TC59	<i>ΔlytST::cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pBSBP _{ysbAB} → TC58
<i>Bs</i> , TC60	<i>ΔysbAB::cm</i>	pGEMTeasy_ <i>ysbAB::cm</i> → BSB168
<i>Bs</i> , TC61	<i>ΔysbB::cm</i>	pGEMTeasy_ <i>ysbB::cm</i> → BSB168
<i>Bs</i> , TC62	<i>ΔysbA::cm P_{ysbAB}ysbB</i>	pGEMTeasy_ <i>P_{ysbAB}ysbA::cm</i> →
<i>Bs</i> , TC63	<i>P_{ysbAB}-lacZ/cm</i>	pDG1661_ <i>P_{ysbAB}</i> → BSB168
<i>Bs</i> , TC64	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo P_{ysbAB}-lacZ/cm</i>	TC63 → GM2907
<i>Bs</i> , TC73	<i>lytST::cm P_{hs}lytST/erm</i>	pMUTIN4- <i>lytST</i> → TC58
<i>Bs</i> , TC74	<i>ΔysbAB::cm amyE::P_{hs}ysbAB/spec</i>	pDR111_ <i>ysbAB</i> → TC60

Souche	Génotype	Source ^a
<i>Bs</i> , TC75	$\Delta ysbB::cm$ <i>amyE::P_{hs}ysbAB/spec</i>	pDR111_ysbAB → TC61
<i>Bs</i> , TC76	$\Delta ysbA::cm$ <i>P_{ysbAB}ysbB amyE::P_{hs}ysbAB</i>	pDR111_ysbAB → TC62
<i>Bs</i> , TC86	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo maeA::aphA3</i>	TC01 → GM2907
<i>Bs</i> , TC87	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo ywkB::pMUTIN2 (erm)</i>	TC03 → GM2907
<i>Bs</i> , TC88	<i>maeA::aphA3 P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC01 → TC35
<i>Bs</i> , TC89	<i>ywkB::pMUTIN2 (erm) P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC03 → TC35
<i>Bs</i> , TC90	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo maeA::aphA3 P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC01 → TC36
<i>Bs</i> , TC91	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo ywkB::pMUTIN2 (erm) P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC03 → TC36
<i>Bs</i> , TC99	<i>crh::aphA3 ptsH1~cat</i>	GM2925 → GM2933
<i>Bs</i> , TC100	<i>crh::aphA3 P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	GM2925 → TC35
<i>Bs</i> , TC101	<i>ptsH1~cat P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC35 → GM2933
<i>Bs</i> , TC102	<i>crh::aphA3 ptsH1~cat P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	GM2925 → TC101
<i>Bs</i> , TC103	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo maeA::aphA3 P_{hs}malS/cm</i>	TC29 → TC86
<i>Bs</i> , TC104	<i>maeA::aphA3 P_{hs}malS/cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC29 → TC88
<i>Bs</i> , TC105	<i>ccpA::Tn617Δ(term lacZ)::phleo maeA::aphA3 P_{hs}MalS/cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC29 → TC90
<i>Bs</i> , TC112	$\Delta ysbAB::cm$ <i>P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC35 → TC60
<i>Bs</i> , TC113	$\Delta ysbB::cm$ <i>P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC35 → TC61
<i>Bs</i> , TC114	$\Delta ysbA::PysbAB-ysbB/cm$ <i>P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC35 → TC62
<i>Bs</i> , TC122	<i>P_{ysbAB} ysbA-SPA/erm</i>	pYsbA-SPA → BSB168
<i>Bs</i> , TC124	<i>P_{ysbAB} ysbB-SPA/erm</i>	pYsbB-SPA → BSB168
<i>Bs</i> , TC125	<i>P_{ysbAB}-lytT2-gfpmut3/spec</i>	pBSBP _{ysbAB-lytT2} → BSB168
<i>Bs</i> , TC126	<i>P_{ysbAB}-lytT1.2-gfpmut3/spec</i>	pBSBP _{ysbAB-lytT1.2} → BSB168
<i>Bs</i> , TC132	<i>amyE::P_{hs}ysbAB/spec</i>	pDR111_ysbAB → BSB168
<i>Bs</i> , TC136	<i>amyE::P_{hs}ysbAB/spec P_{ysbAB}-gfpmut3/cm</i>	pBSBIXP _{ysbAB} → TC132
<i>Bs</i> , TC149	<i>P_{ysbAB}-lytT1-gfpmut3/spec</i>	pBSBP _{ysbAB-lytT1} → BSB168
<i>Bs</i> , TC150	$\Delta ysbAB::cm$ <i>P_{ysbAB}-lytT1/spec</i>	TC60 → TC149
<i>Bs</i> , TC151	$\Delta ysbAB::cm$ <i>P_{ysbAB}-lytT1,2/spec</i>	TC60 → TC126
<i>Bs</i> , TC152	$\Delta ysbAB::cm$ <i>P_{ysbAB}-lytT2/spec</i>	TC60 → TC125
<i>Bs</i> , TC153	$\Delta ysbAB::cm$ <i>P_{hs}ysbAB/erm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pDG1664_ <i>P_{hs}ysbAB</i> → TC112
<i>Bs</i> , TC154	$\Delta ysbAB::cm$ <i>P_{hs}ysbAB/erm</i>	pDG1664_ <i>P_{hs}ysbAB</i> → TC60

Souche	Génotype	Source ^a
<i>Bs</i> , TC163	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo ysbAB::cm</i>	TC60 → GM2907
<i>Bs</i> , TC164	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo ysbAB::cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC60 → TC133
<i>Bs</i> , TC166	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo ysbAB::cm P_{ysbAB-lytT1,2}/spec</i>	TC60 → TC147
<i>Bs</i> , TC175	<i>P_{hs}P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pDR111P _{hs} P _{ysbAB} → BSB168
<i>Bs</i> , TC178	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phléo P_{hs}P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	GM2907 → TC175
<i>Bs</i> , TC180	<i>lytTS::cm ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phléo</i>	GM2907 → TC58
<i>Cg</i> , ATCC13032	<i>C.glutamicum</i> , WT	(jolkver)
<i>Cg</i> , Cg0953	<i>C.glutamicum</i> , $\Delta mctC$	(jolkver)
<i>Cg</i> , ATCC130TC	WT <i>P_{tac}-ysbAB/cm</i>	Xmj19- <i>ysbAB</i> → ATCC13032
<i>Cg</i> , Cg0953TC	$\Delta mctC$ <i>P_{tac}-ysbAB/cm</i>	Xmj19- <i>ysbAB</i> → Cg0953

1

^a les flèches indiquent vers quelles souches sont faites les transformations

1 **Tableau 5. Liste des amorces utilisées au cours de ce travail**

Amorces	Séquences (5'→3') ^a	Sources
souche TC35		
P _{ysbAB_FW}	CCGCGGGCTTTCCCAGCCTCTTGATTATTTAACCAA	BSB168
P _{ysbAB_RV}	GTTCTCCTTCCCACCCCTCATTATAAATAAGAA	BSB168
souche TC58		
PCR_LytT_FW	GATAAAGGAAGCGCAATTGC	BSB168
PCR_LytT_RV	CAATGGAACAGGCAGTTTAA	BSB168
Cm_lytT_FW	TCCCCCGGGGGATTACACGACAAACAACAGATAAAA	pDRDG2
Cm_lytT_RV	CCATCGATGGTATAAAAACCTTCTTCAACTAACGGG	pDRDG2
strain TC63		
PCR_PysbB_FW	CGGGATCCCGTTTGGTACCCTCATTATAAATAAGAA	BSB168
PCR_PysbB_RV	CCCAAGCTTGGGGCTTTGTCTGAATACTGAATATA	BSB168
souches TC60, TC61, TC62		
PCR_insert_ysbAB_FW	CCCCACCCAGAATACAAAGA	BSB168
PCR_insert_ysbAB_RV	GGATGAACTGGCTTACTTGC	BSB168
RevPCR_pGEM_ysbA_FW	TCCCCCGGGGGAAATCATATTTGAAACCAGCATAAT	pGEMT-ysbAB
RevPCR_pGEM_ysbA_RV	GCTCTAGAGCACAAAAACAGTGCAAAGCCCGCAGAA	pGEMT-ysbAB
RevPCR_pGEM_ysbB_FW	TCCCCCGGGGGAACCATGGCAACAAACAAAGGAGTGA	pGEMT-ysbAB
RevPCR_pGEM_ysbB_RV	GCTCTAGAGCTAAAGGATTGGCTCTTGGAACATCCG	pGEMT-ysbAB
PCR_cm_FW	TCCCCCGGGGGGATCTTTATTCTTCAACTAAAGCACCCATTAG	pDRDG2
PCR_cm_RV	GCTCTAGAGCGTAGAGGATCTGGAGCTGTA	pDRDG2
PCR_cm_pysbAB_FW	GCTCTAGAGCGGATCCCGTTTGGTACCCTCATTATA	pDG1661_P _{ysbAB}
PCR_cm_pysbAB_RV	TCCCCCGGGGGAATAAAAACCTTCTTCAACTAACGG	pDG1661_P _{ysbAB}
souche TC73		
PCR_lytST_FW	CGGGATCCCATATTTTTTCTCCGCCTGTAAGCAAGTT	BSB168
PCR_lytST_RV	CGAGCTCGTTATAAAGCGCTTACAAGATAACATGCC	BSB168
souches TC74, TC75, TC76		
PCR_ysbAB_FW	TCACGCGTCGACAGGAGGACTACTATGAGTGCTAAAAAAGT	BSB168
PCR_ysbB_RV	TCCTAGCTAGCTTATCCTCCGATCAGCTGCACGAACAC	BSB168

Amorces	Séquences (5'→3') ^a	Sources
souches TC153, TC154		
Revpic618 FW	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAACTTAAGAGTGTGTT	pDG1664
revpic618 RV	CTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACG	pDG1664
PhsysbAB FW	AAATACGGGCAGACATGGCCTGCCCGGTTATTATTA	pDR111_ysbAB
PhsysbAB RV	AAGGAAAAAAGCGGCCGCGATTAATTAATTCAGAACGCTCG	pDR111_ysbAB
souches TC125, TC126, TC149		
PCRlytT1_FW	CGGGATCCATTCTGCAACTCAGACCCGCTATACG	pBSBII-P _{ysbAB}
PCRlytT1,2_FW	CGGGATCCAGACCCGCTATACGGCATGTTATCT	pBSBII-P _{ysbAB}
PCRlytT2_RV	GCGGATCCCGCAAATGGCTGAAATGCAA	pBSBII-P _{ysbAB}
PCRlytT1,2_RV	GCGGATCCCGAAAAAGCCGCCCATCAAATATGG	pBSBII-P _{ysbAB}
souche TC175		
PysbABgfp_FW	ACGCGTCGACGATGGGCGGCTTTTTGCATTTTCAGCC	pBSBII-P _{ysbAB}
PysbABgfp_RV	ACATGCATGCATGTACTTCTCACCAATAAAAAAC	pBSBII-P _{ysbAB}
souches de <i>C. glutamicum</i>		
ysbABCG_FW	AAA <u>ACTGCAG</u> AGGAGGACTACTATGAGTGCTAAAAAAGTGT	BSB168
ysbABCG_RV	TCCCCCGGGGTTATCCTCCGATCAGCTGCACGAACAC	BSB168
souches TC37, TC38		
PCR_P _{dctP} _FW	CCGCGGGCTTTCCCAGCTGAAGTGGATGTCATTGT	BSB168
PCR_P _{dctP} _RV	GTTCCCTCCTTCCCACCCCTATTCGCCTTTTGTGTC	BSB168
PCR_maeA_FW	TCACGCGTCGACAGGAGGACTACTATGGGTTATTACTTAACT	BSB168
PCR_maeA_RV	TCACATGCATGCTTATTTTCGCGATGACTTTTTTGTATTCAGGT	BSB168
PCR_malS_FW	TCACGCGTCGACAGGAGGACTACTGTGAAACAATTCAGAGTA	BSB168
PCR_malS_RV	TCACATGCATGCTTATATCGCGCGAATCGGTTTGTATAC	BSB168
PCR_mleA_FW	ACGCGTCGACAGGAGGACTACTATGATAGCGAAACACATGA	BSB168
PCR_mleA_RV	CTAGCTAGCTTTTGGCATGTGATCACTC	BSB168
PCR_ytsJ_FW	ACGCGTCGACAGGAGGACTACTATGTCATTAAGAGAAGAAG	BSB168
PCR_ytsJ_RV	ACATGCATGCCGCGCTGCCATTTTTGGAATGAATTA	BSB168

^a Les sites de restrictions utilisés sont soulignés.

Bibliographie

- Anagnostopoulos C & Spizizen J (1961) Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**: 741–746
- Asai K, Baik SH, Kasahara Y, Moriya S & Ogasawara N (2000) Regulation of the transport system for C4-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 263–271
- Aymerich S, Goelzer A & Fromion V (2007) Transcriptional controls of the central carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. In *global regulatory networks in Bacillus subtilis*, Fujita Y (ed) p 249. Transworld research network
- Bachem S, Faires N & Stülke J (1997) Characterization of the presumptive phosphorylation sites of the *Bacillus subtilis* glucose permease by site-directed mutagenesis: Implication in glucose transport and catabolite repression. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 233–238
- Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Médigue C & Danchin A (2009) From a consortium sequence to a unified sequence: The *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**: 1758–1775
- Beijer L, Nilsson RP, Holmberg C & Rutberg L (1993) The glpP and glpF genes of the glycerol regulon in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 349–359
- Bender T, Pena G & Martinou J (2015) Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes. *embo* **34**: 911–925
- Berg J, Tymoczko J & Stryer L (2002) Biochemistry. 5th edition Freeman WH (ed)
- Bergmann S, Rohde M & Hammerschmidt S (2004) Dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* Is a Surface-Displayed Plasminogen-Binding Protein Glyceraldehyde-3-Phosphate **72**: 2416–2419
- Blencke H-M, Homuth G, Ludwig H, Mäder U, Hecker M & Stülke J (2003) Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab. Eng.* **5**: 133–149
- Bonafe N (2005) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Binds to the AU-Rich 3' Untranslated Region of Colony-Stimulating Factor-1 (CSF-1) Messenger RNA in Human Ovarian Cancer Cells: Possible Role in CSF-1 Posttranscriptional Regulation and Tumor Phenotype. *Cancer Res.* **65**: 3762–3771
- Boorsma A, Van Der Rest M, Lolkema JS & Konings WN (1996) Secondary Transporters for Citrate and the Mg. *J. Bacteriol.* **178**: 6216–6222

- Botella E, Fogg M, Jules M, Piersma S, Doherty G, Hansen A, Denham EL, Le Chat L, Veiga P, Bailey K, Lewis PJ, Van Dijl JM, Aymerich S, Wilkinson AJ & Devine KM (2010) pBaSysBioII: An integrative plasmid generating gfp transcriptional fusions for high-throughput analysis of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **156**: 1600–1608
- Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen Y-C, Cox JE, Cardon CM, Van Vranken JG, Dephoure N, Redin C, Boudina S, Gygi SP, Brivet M, Thummel CS & Rutter J (2012) A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate Uptake in Yeast, Drosophila, and Humans. *Science* (80-.). **337**: 96–100
- Bücker R, Heroven AK, Becker J, Dersch P & Wittmann C (2014) The Pyruvate-Tricarboxylic Acid Cycle Node. *J. Biol. Chem.* **289**: 30114–30132 Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.581348>
- Buescher JM, Liebermeister W, Jules M, Uhr M, Muntel J, Botella E, Hessling B, Kleijn RJ, Le Chat L, Lecointe F, Maeder U, Nicolas P, Piersma S, Ruegheimer F, Becher D, Bessieres P, Bidnenko E, Denham EL, Dervyn E, Devine KM, et al (2012) Global Network Reorganization During Dynamic Adaptations of *Bacillus subtilis* Metabolism. **1099**: Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1206871>
- Busch W & Saier MH (2002) The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**: 287–337
- Cai L, Cai S, Zhao D, Wu J, Wang L, Liu X, Li M, Hou J, Zhou J, Liu J, Han J & Xiang H (2014) Analysis of the transcriptional regulator GlpR, promoter elements, and posttranscriptional processing involved in fructose-induced activation of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system in *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 1430–1440
- Chang D-E, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS & Conway T (2004) Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 7427–7432
- Chauvaux S, Paulsen IT & Jr MHS (1998) CcpB , a Novel Transcription Factor Implicated in Catabolite Repression in *Bacillus subtilis*. **180**: 491–497
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM & Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**: 381–389
- Chen Y, Gozzi K, Yan F & Chai Y (2015) Acetic Acid Acts as a Volatile Signal To Stimulate Bacterial Biofilm. *MBio* **6**: 1–13
- Cheung J & Hendrickson W a. (2010) Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 116–123 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.016>

- Chubukov V, Uhr M, Le Chat L, Kleijn RJ, Jules M, Link H, Aymerich S, Stelling J & Sauer U (2013) Transcriptional regulation is insufficient to explain substrate-induced flux changes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Syst. Biol.* **9**: 709 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281055>
- Contesse G, Crépin M, Gros F, Ullmann A & Monod J (1970) On the mechanism of catabolite repression. In *The lactose operon*, Beckwith JR & Zipser D (eds) pp 401–4015. Cold Spring Harbor
- Contiero J, Beatty C, Kumari S, DeSanti CL, Strohl WR & Wolfe a (2000) Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 421–430
- Delbaere LTJ, Sudom AM, Prasad L, Leduc Y & Goldie H (2004) Structure/function studies of phosphoryl transfer by phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1697**: 271–278
- Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 87–93
- Deutscher J, Francke C & Postma PW (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 939–1031
- Deutscher J, Galinier A & Martin-Verstraete I (2002) Carbohydrate uptake and metabolism. In *Bacillus subtilis and its closest relatives from genes to cells*, Sonenshein AL Hoch JA & Losick R (eds) pp 129–151.
- Deutscher J, Kessler U & Hengstenberg W (1985) Streptococcal phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system: Purification and characterization of a phosphoprotein phosphatase which hydrolyzes the phosphoryl bond in seryl-phosphorylated histidine-containing protein. *J. Bacteriol.* **163**: 1203–1209
- Deutscher J, Küster E, Bergstedt U, Charrier V & Hillen W (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 1049–1053
- Deutscher J, Reizer J, Fischer C, Galinier a., Saier MH & Steinmetz M (1994) Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the ptsH gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**: 3336–3344
- Didierjean C, Corbier C, Fatih M, Favier F, Boschi-Muller S, Branlant G & Aubry A (2003) Crystal structure of two ternary complexes of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* with NAD and D-glyceraldehyde 3-phosphate. *J. Biol. Chem.* **278**: 12968–12976
- Diesterhaft MD & Freese E (1973) Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **248**: 6062–6070

- Doan T & Aymerich S (2003) Regulation of the central glycolytic genes in *Bacillus subtilis*: Binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by fructose-1,6-bisphosphate. *Mol. Microbiol.* **47**: 1709–1721
- Doan T, Servant P, Tojo S, Yamaguchi H, Lerondel G, Yoshida KI, Fujita Y & Aymerich S (2003) The *Bacillus subtilis* ywxA gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology* **149**: 2331–2343
- Eckart R a., Brantl S & Licht A (2009) Search for additional targets of the transcriptional regulator CcpN from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **299**: 223–231
- Fabret C, Feher V a & Hoch J a (1999) Two-Component Signal Transduction in *Bacillus subtilis* : How One Organism Sees Its *J. Bacteriol.* **181**: 1975–1983
- Ferguson EC & Rathmell JC (2008) New roles for pyruvate kinase M2: working out the Warburg effect. *Trends Biochem. Sci.* **33**: 359–362
- Ferguson ML, Le Coq D, Jules M, Aymerich S, Radulescu O, Declerck N & Royer C a. (2012) Reconciling molecular regulatory mechanisms with noise patterns of bacterial metabolic promoters in induced and repressed states. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 155–160
- Ferreira-da-Silva F, Pereira PJB, Gales L, Roessle M, Svergun DI, Moradas-Ferreira P & Damas AM (2006) The crystal and solution structures of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reveal different quaternary structures. *J. Biol. Chem.* **281**: 33433–33440
- Figge RM, Schubert M, Brinkmann H & Cerff R (1999) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene diversity in eubacteria and eukaryotes: evidence for intra- and inter-kingdom gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 429–440
- Fillinger S, Boschi-Muller S, Azza S, Dervyn E, Branlant G & Aymerich S (2000) Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J. Biol. Chem.* **275**: 14031–14037
- Fried L, Behr S, & Jung K (2013) Identification of a target gene and activating stimulus for the YpdA/YpdB histidine kinase/response regulator system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195(4):807-815
- Froger A & Delamarche C (2000) predictive approach and functional characterisation of mip family channels. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=202238> [Accessed September 3, 2015]
- Fujita Y (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 245–259
- Fujita Y & Freese E (1979) Purification and properties of and Properties of Fructose-1 , 6-bisphosphatase of Bacilhs.
- Fujita Y & Freese E (1981) Isolation and properties of a *Bacillus subtilis* mutant unable to produce fructose-bisphosphatase. *J. Bacteriol.* **145**: 760–767

- Fujita Y, Yoshida K, Miwa Y, Yanai N, Nagakawa E & Kasahara Y (1998) Identification and expression of the *Bacillus subtilis* fructose-1, 6-bisphosphatase gene (fbp). *J. Bacteriol.* **180**: 4309–4313
- Gao H, Jiang X, Pogliano K & Aronson AI (2002) The E1beta and E2 subunits of the *Bacillus subtilis* pyruvate dehydrogenase complex are involved in regulation of sporulation. *J. Bacteriol.* **184**: 2780–2788
- Gao R & Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 133–154
- Garrett DS, Seok YJ, Peterkofsky a, Gronenborn a M & Clore GM (1999) Solution structure of the 40,000 Mr phosphoryl transfer complex between the N-terminal domain of enzyme I and HPr. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 166–173
- Gerhard M (1998) Biochemical Pathways : an Atlas of Biochemistry and Molecular Biology Gerhard M (ed) Spektrum Akademischer Verlag, John Wiley & Sons, INC.
- Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, Martínez JP & Gozalbo D (1997) The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* **179**: 4992–4999
- Gimpel M, Heidrich N, Mäder U, Krügel H & Brantl S (2010) A dual-function sRNA from *B. subtilis*: SR1 acts as a peptide encoding mRNA on the gapA operon. *Mol. Microbiol.* **76**: 990–1009
- Gonzy-Tréboul G, de Waard JH, Zagorec M & Postma PW (1991) The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for IIGlc and IIIGlc domains. *Mol. Microbiol.* **5**: 1241–1249
- Görke B, Frayse L & Galinier A (2004) Drastic Differences in Crh and HPr Synthesis Levels Reflect Their Different Impacts on Catabolite Repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **186**: 2992–2995
- Görke B & Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 613–624
- Gösseger R, Küster E, Galinier a, Deutscher J & Hillen W (1997) Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals. *J. Mol. Biol.* **266**: 665–676
- Gray LR, Tompkins SC & Taylor EB (2013) Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**: 2577–2604
- Halestrap a P (1975) The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem. J.* **148**: 85–96
- Halestrap a P & Denton RM (1974) Specific inhibition of pyruvate transport in rat liver mitochondria and human erythrocytes by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. *Biochem. J.* **138**: 313–316

- Harwood CR & Cutting SM (1990) Chemically defined growth media and supplements. In *Molecular Biological Methods for Bacillus*, Harwood CR & Cutting SM (eds) p 548. Wiley-interscience
- Vander Heiden MG, Cantley LC & Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**: 1029–1033
- Hemila H, Palva a., Paulin L, Arvidson S & Palva I (1990) Secretory S complex of *Bacillus subtilis*: Sequence analysis and identity to pyruvate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **172**: 5052–5063
- Henkin TM, Grundy FJ, Nicholson WL & Chambliss GH (1991) Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* lacI and galR repressors. *Mol. Microbiol.* **5**: 575–584
- Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey J, Zamboni N, Westermann B, Kunji ERS & Martinou J (2012) Expression of the Mitochondrial. *Science* (80-.). **1942**:
- Higgins CF (2001) ABC transporters: Physiology, structure and mechanism - An overview. *Res. Microbiol.* **152**: 205–210
- Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie J a, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD & Bell a W (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448–450
- Hollenstein K, Dawson RJ & Locher KP (2007) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**: 412–418
- Hosie a HF, Allaway D & Poole PS (2002) A monocarboxylate permease of *Rhizobium leguminosarum* is the first member of a new subfamily of transporters. *J Bacteriol* **184**(19):5436-5448.
- Hughes MJG, Moore JC, Lane JD, Wilson R, Pribul PK, Younes ZN, Dobson RJ, Everest P, Reason AJ, Redfern JM, Greer FM, Paxton T, Panico M, Morris HR, Feldman RG & Santangelo JD (2002) Identification of Major Outer Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Society* **70**: 1254–1259
- Jia B, Linh LT, Lee S, Pham BP, Liu J, Pan H, Zhang S & Cheong GW (2011) Biochemical characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Extremophiles* **15**: 337–346
- Jing Jing Ye & Saier MH (1996) Regulation of sugar uptake via the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems in *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* is mediated by ATP-dependent phosphorylation of seryl residue 46 in HPr. *J. Bacteriol.* **178**: 3557–3563
- Jolkver E, Emer D, Ballan S, Krämer R, Eikmanns BJ & Marin K (2009) Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **191**: 940–948

- Jules M, Le Chat L, Aymerich S & Le Coq D (2009) The *Bacillus subtilis* ywjI (glpX) gene encodes a class II fructose-1,6-bisphosphatase, functionally equivalent to the class III Fbp enzyme. *J. Bacteriol.* **191**: 3168–3171
- Kawai S, Suzuki H, Yamamoto K, Inui M, Yukawa H & Kumagai H (1996) Purification and characterization of a malic enzyme from the ruminal bacterium *Streptococcus bovis* ATCC 15352 and cloning and sequencing of its gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2692–2700
- Kleijn RJ, Buescher JM, Le Chat L, Jules M, Aymerich S & Sauer U (2010) Metabolic fluxes during strong carbon catabolite repression by Malate in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **285**: 1587–1596
- Koksharova O, Schubert M, Shestakov S & Cerff R (1998) Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* **36**: 183–194
- Konings WN (2006) Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **90**: 325–342
- Korndörfer I, Steipe B, Huber R, Tomsch a & Jaenicke R (1995) The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **246**: 511–521
- Krebs H a. & Johnson W a. (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**: 148–156
- Kreth J, Lengeler JW & Jahreis K (2013) Characterization of Pyruvate Uptake in *Escherichia coli* K-12. *PLoS One* **8**: 6–12
- Krom BP, Aardema R & Lolkema JS (2001) *Bacillus subtilis* YxkJ is a secondary transporter of the 2-hydroxycarboxylate transporter family that transports L-malate and citrate. *J. Bacteriol.* **183**: 5862–5869
- Kundig W, Ghosh S & Roseman S (1964) Phosphate Bound To Histidine in a Protein As an Intermediate in a Novel Phospho-Transferase System*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **52**: 1067–1074
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini a M, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessi res P, Bolotin a, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans a, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi C V, Caldwell B, Capuano V, et al (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249–256
- Lang VJ, Leystra-lantz C & Cook R a (1987) Characterization of the Specific Pyruvate Transport System in *Escherichia coli* K-12. **169**:
- Laub MT & Goulian M (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu. Rev. Genet.* **41**: 121–145

- Lehman MK, Bose JL, Sharma-Kuinkel BK, Moormeier DE, Endres JL, Sadykov MR, Biswas I & Bayles KW (2014) Identification of the amino acids essential for LytSR-mediated signal transduction in *Staphylococcus aureus* and their roles in biofilm-specific gene expression. *Mol. Microbiol.* **95**: 1–46 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25491472>
- Lerondel G, Doan T, Zamboni N, Sauer U & Aymerich S (2006) YtsJ has the major physiological role of the four paralogous malic enzyme isoforms in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**: 4727–4736
- Leyn S a., Kazanov MD, Sernova N V., Ermakova EO, Novichkov PS & Rodionova D a. (2013) Genomic reconstruction of the transcriptional regulatory network in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **195**: 2463–2473
- Li S, Huang D, Li Y, Wen J & Jia X (2012) Rational improvement of the engineered isobutanol-producing *Bacillus subtilis* by elementary mode analysis. *Microb. Cell Fact.* **11**: 101 Available at: <http://www.microbialcellfactories.com/content/11/1/101>
- Licht A & Brantl S (2009) The transcriptional repressor CcpN from *Bacillus subtilis* uses different repression mechanisms at different promoters. *J. Biol. Chem.* **284**: 30032–30038
- Licht A, Golbik R & Brantl S (2008) Identification of Ligands Affecting the Activity of the Transcriptional Repressor CcpN from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **380**: 17–30
- Licht A, Preis S & Brantl S (2005) Implication of CcpN in the regulation of a novel untranslated RNA (SR1) in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **58**: 189–206
- Link H, Kochanowski K & Sauer U (2013) Systematic identification of allosteric protein-metabolite interactions that control enzyme activity in vivo. *Nat. Biotechnol.* **31**: 357–61 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23455438>
- Lorca GL, Lorca GL, Weyler W, Weyler W, Schilling CH, Schilling CH, Saier MH & Saier MH (2005) Catabolite Repression and Activation in. *Society* **187**: 7826–7839
- Ludwig H, Homuth G, Schmalisch M, Dyka FM, Hecker M & Stülke J (2001) Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: Evidence for the presence of multiple levels of control of the gapA operon. *Mol. Microbiol.* **41**: 409–422
- Ludwig H, Meinken C, Matin a & Stulke J (2002) Insufficient expression of the ilv-leu operon encoding enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis limits growth of a *Bacillus subtilis* ccpA mutant. *J. Bacteriol.* **184**: 5174–5178 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193635>
- Marciniak BC, Pabijaniak M, de Jong A, Dühring R, Seidel G, Hillen W & Kuipers OP (2012) High- and low-affinity cre boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. *BMC Genomics* **13**: 401

- Markossian K a, Khanova H a, Kleimenov SY, Levitsky DI, Chebotareva N a, Asryants R a, Muronetz VI, Saso L, Yudin IK & Kurganov BI (2006) Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **45**: 13375–13384
- Meyer FM, Gerwig J, Hammer E, Herzberg C, Commichau FM, Völker U & Stülke J (2011a) Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: Evidence for a metabolon. *Metab. Eng.* **13**: 18–27
- Meyer FM, Jules M, Mehne FMP, Le Coq D, Landmann JJ, Görke B, Aymerich S & Stülke J (2011b) Malate-mediated carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis* involves the HPrK/CcpA pathway. *J. Bacteriol.* **193**: 6939–6949
- Meyer FM & Stülke J (2013) Malate metabolism in *Bacillus subtilis*: Distinct roles for three classes of malate-oxidizing enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* **339**: 17–22
- Mittal M, Pechter KB, Picossi S, Kim HJ, Kerstein KO & Sonenshein AL (2013) Dual role of CcpC protein in regulation of aconitase gene expression in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *Microbiol. (United Kingdom)* **159**: 68–76
- Miwa Y, Nakata a, Ogiwara a, Yamamoto M & Fujita Y (2000) Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **28**: 1206–1210
- Monahan LG, Hajduk I V., Blaber SP, Charles IG & Harry EJ (2014) Coordinating bacterial cell division with nutrient availability: A role for glycolysis. *MBio* **5**: 1–13
- Monod J (1942) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Université de Paris, France
- Moreno MS, Schneider BL, Maile RR, Weyler W & Saier MH (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol. Microbiol.* **39**: 1366–1381
- Mouchiroud L, Molin L, Kasturi P, Triba MN, Dumas ME, Wilson MC, Halestrap AP, Roussel D, Masse I, Dallièrè N, Ségalat L, Billaud M & Solari F (2011) Pyruvate imbalance mediates metabolic reprogramming and mimics lifespan extension by dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **10**: 39–54
- Muñoz-Márquez ME & Ponce-Rivas E (2010) Effect of pfkA chromosomal interruption on growth, sporulation, and production of organic acids in *Bacillus subtilis*. *J. Basic Microbiol.* **50**: 232–240
- Murai T & Tokushige M (1971) Physiological functions of NAD- and NADP-linked malic enzymes in *Escherichia coli*. ... *Biophys. Res. ...* **43**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4397922>
- Nagy E, Henics T, Eckert M, Miseta a, Lightowlers RN & Kellermayer M (2000) Identification of the NAD(+)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 253–260

- Nahku R, Valgepea K, Lahtvee P-J, Erm S, Abner K, Adamberg K & Vilu R (2010) Specific growth rate dependent transcriptome profiling of *Escherichia coli* K12 MG1655 in accelerostat cultures. *J. Biotechnol.* **145**: 60–65
- Nicolas P, Maeder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, Becher D, Bisicchia P, Botella E, Delumeau O, Doherty G, Denham EL, Fogg MJ, Fromion V, Goelzer A, Hansen A, et al (2012) Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. **1103**: Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1206848>
- Owen OE, Kalhan SC & Hanson RW (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* **277**: 30409–30412
- Pao SS, Paulsen IT & Saier MH (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1–34
- Patel MS, Nemeria NS, Furey W & Jordan F (2014) The pyruvate dehydrogenase complexes: Structure-based function and regulation. *J. Biol. Chem.* **289**: 16615–16623
- Patton TG, Yang SJ & Bayles KW (2006) The role of proton motive force in expression of the *Staphylococcus aureus* cid and lrg operons. *Mol. Microbiol.* **59**: 1395–1404
- Paulsen IT, Chauvaux S, Choi P & Saier MH (1998) Characterization of Glucose-Specific Catabolite Repression-Resistant Mutants of *Bacillus subtilis*: Identification of a Novel Hexose : H⁺ Symporter Characterization of Glucose-Specific Catabolite Repression-Resistant Mutants of *Bacillus subtilis*: Identi. *J. Bacteriol.* **180**: 498–504
- Paulsen IT, Nguyen L, Sliwinski MK, Rabus R & Saier MH (2000) Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. *J. Mol. Biol.* **301**: 75–100
- Pick TR, Bräutigam A, Schulz M a, Obata T, Fernie AR & Weber APM (2013) PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 3185–90 Available at: <http://www.pnas.org/content/110/8/3185>
- Pickl A, Johnsen U & Schönheit P (2012) Fructose degradation in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a bacterial type phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system, fructose-1-phosphate kinase, and class II Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Bacteriol.* **194**: 3088–3097
- Podgornaia AI & Laub MT (2013) Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**: 156–162 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.004>
- Postma PW, Lengeler JW & Jacobson GR (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543–594
- Presecan-Siedel E, Galinier A, Longin R, Deutscher J, Danchin A, Glaser P & Martin-Verstraete I (1999) Catabolite regulation of the pta gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 6889–6897

- Rampelt H & Laan M Van Der (2015) Metabolic remodeling : a pyruvate transport affair. : 1–4
- Ramström H, Sanglier S, Leize-Wagner E, Philippe C, Van Dorsselaer A & Haiech J (2003) Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 1174–1185
- Reddy VS, Shlykov M a., Castillo R, Sun EI & Saier MH (2012) The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J.* **279**: 2022–2035
- Rice KC, Nelson JB, Patton TG, Bayles KW & Yang S (2005) Acetic Acid Induces Expression of the *Staphylococcus aureus* cidABC and lrgAB Murein Hydrolase Regulator Operons Acetic Acid Induces Expression of the *Staphylococcus aureus* cidABC and lrgAB Murein Hydrolase Regulator Operons. **187**: 813–821
- Roche TE & Hiromasa Y (2007) Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 830–849
- Roitel O, Ivinova O, Muronetz V, Nagradova N & Branlant G (2002) Thermal unfolding used as a probe to characterize the intra- and intersubunit stabilizing interactions in phosphorylating D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry* **41**: 7556–7564
- Roitel O, Sergienko E & Branlant G (1999) Dimers generated from tetrameric phosphorylating glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* are inactive but exhibit cooperativity in NAD binding. *Biochemistry* **38**: 16084–16091
- Ronimus RS & Morgan HW (2001) The biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinases from extremophiles. *Extremophiles* **5**: 357–373
- Sadykov MR & Bayles KW (2012) The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: A coordination of physiological signals. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**: 211–215 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.010>
- Saeed F a. (2000) Production of pyruvate by *Candida albicans*: Proposed role in virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 35–38
- Saier Jr. MH (2015) The Bacterial Phosphotransferase System: New Frontiers 50 Years after Its Discovery. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 73–78 Available at: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000381215>
- Saier MH (2000a) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 354–411
- Saier MH (2000b) Families of Proteins Forming Transmembrane Channels. *J. Membr. Biol.* **180**: 165–180

- Saier MH, Goldman SR, Maile RR, Moreno MS, Weyler W, Yang N & Paulsen IT (2002a) Overall transport capabilities of *Bacillus subtilis*. In *Bacillus subtilis and its closest relatives from genes to cells*, Sonenshein AL Hoch JA & Losick R (eds) pp 113–128. american society for microbiology
- Saier MH, Goldman SR, Maile RR, Moreno MS, Weyler W, Yang N & Paulsen IT (2002b) Transport capabilities encoded within the *Bacillus subtilis* genome. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 37–67
- Saier MH & Reddy BL (2015) Holins in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: Multifunctional Xenologues with Potential Biotechnological and Biomedical Applications. *J. Bacteriol.* **197**: 7–17 Available at: <http://jb.asm.org/lookup/doi/10.1128/JB.02046-14>
- Saier MH, Reddy VS, Tamang DG & Västermark Å (2014) The transporter classification database. *Nucleic Acids Res.* **42**: 1–8
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Sprin. Sambrook J Fritsch EF & Maniatis T (eds) Cold Spring Harbor
- Sauer U & Eikmanns BJ (2005) The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 765–794
- Schallmeyer M, Singh A & Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**: 1–17
- Schell JC, Olson KA, Jiang L, Hawkins AJ, Van Vranken JG, Xie J, Egnatchik RA, Earl EG, DeBerardinis RJ & Rutter J (2014) A Role for the Mitochondrial Pyruvate Carrier as a Repressor of the Warburg Effect and Colon Cancer Cell Growth. *Mol. Cell* **56**: 400–413 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.026>
- Schumacher M a., Seidel G, Hillen W & Brennan RG (2006) Phosphoprotein Crh-Ser46-P displays altered binding to CcpA to effect carbon catabolite regulation. *J. Biol. Chem.* **281**: 6793–6800
- Schumacher M a., Sprehe M, Bartholomae M, Hillen W & Brennan RG (2010) Structures of carbon catabolite protein A-(HPr-Ser46-P) bound to diverse catabolite response element sites reveal the basis for high-affinity binding to degenerate DNA operators. *Nucleic Acids Res.* **39**: 2931–2942
- Seidel G, Diel M, Fuchsbauer N & Hillen W (2005) Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and cre in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* **272**: 2566–2577
- Servant P, Le Coq D & Aymerich S (2005) CcpN (YqzB), a novel regulator for CcpA-independent catabolite repression of *Bacillus subtilis* gluconeogenic genes. *Mol. Microbiol.* **55**: 1435–1451
- Sharma-Kuinkel BK, Mann EE, Ahn JS, Kuechenmeister LJ, Dunman PM & Bayles KW (2009) The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *J. Bacteriol.* **191**: 4767–4775

- Shivers RP, Dineen SS & Sonenshein AL (2006) Positive regulation of *Bacillus subtilis* ackA by CodY and CcpA: Establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Mol. Microbiol.* **62**: 811–822
- Shivers RP & Sonenshein AL (2005) *Bacillus subtilis* ilvB operon: An intersection of global regulons. *Mol. Microbiol.* **56**: 1549–1559
- Sinai L, Rosenberg A, Smith Y, Segev E & Ben-Yehuda S (2015) The Molecular Timeline of a Reviving Bacterial Spore. *Mol. Cell* **57**: 695–707 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276514009976>
- Singh KD, Schmalisch MH, Stülke J & Görke B (2008) Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: Quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J. Bacteriol.* **190**: 7275–7284
- Slack FJ, Mueller JP & Sonenshein a. L (1993) Mutations that relieve nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *J. Bacteriol.* **175**: 4605–4614
- Slack FJ, Serror P, Joyce E & Sonenshein AL (1995) A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *Mol. Microbiol.* **15**: 689–702
- Sonenshein AL (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 203–207
- Sonenshein AL (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 917–927
- Sonenshein AL, Hoch JA & Losick R (2002) *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives : from genes to cells Washington DC: American Society for Microbiology Press
- Steinmetz M (1993) Carbohydrate Catabolism: Pathways, Enzymes, Genetic Regulation and evolution. In *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, Sonenshein AL Hoch JA & Losick R (eds) pp 157–170. washington, DC: american society for microbiology
- Steinmetz M & Richter R (1994) Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.* **176**: 1761–1763
- Stock AM, Robinson VL & Goudreau PN (2000) T_Wo -C Omponent S Ignal T Ransduction. *Reactions* **69**: 183–215 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966457>
- Szent-Györgyi A (1937) Oxidation, energy transfer, and vitamins. *Lect. Nobel price*
- Talfournier F, Colloc'h N, Mornon J-P & Branlant G (1999) Functional characterization of the phosphorylating D -glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from the archaeon *Methanothermus fervidus* by comparative molecular modelling and site-directed mutagenesis Franc. *Eur. J. Biochem.* **104**: 93–104

- Tanaka K, Henry CS, Zinner JF, Jolivet E, Cohoon MP, Xia F, Bidnenko V, Ehrlich SD, Stevens RL & Noirot P (2013) Building the repertoire of dispensable chromosome regions in *Bacillus subtilis* entails major refinement of cognate large-scale metabolic model. *Nucleic Acids Res.* **41**: 687–699
- Tanaka K, Kobayashi K & Ogasawara N (2003) The *Bacillus subtilis* YufLM two-component system regulates the expression of the malate transporters MaeN (YufR) and YfIS, and is essential for utilization of malate in minimal medium. *Microbiology* **149**: 2317–2329
- Tännler S, Fischer E, Le Coq D, Doan T, Jamet E, Sauer U & Aymerich S (2008) CcpN controls central carbon fluxes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**: 6178–6187
- Timoñ-Gómez A, Proft M & Pascual-Ahuir A (2013) Differential regulation of mitochondrial pyruvate carrier genes modulates respiratory capacity and stress tolerance in yeast. *PLoS One* **8**: 1–9
- Titgemeyer F & Hillen W (2002) Global control of sugar metabolism: A Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **82**: 59–71
- Tojo S, Satomura T, Morisaki K, Deutscher J, Hirooka K & Fujita Y (2005) Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* ilv-leu operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol. Microbiol.* **56**: 1560–1573
- Tolner B, Ubbink-Kok T, Poolman B & Konings WN (1995) Characterization of the proton/glutamate symport protein of *Bacillus subtilis* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 2863–2869
- Trotter EW, Rolfe MD, Hounslow AM, Craven CJ, Williamson MP, Sanguinetti G, Poole RK & Green J (2011) Reprogramming of *Escherichia coli* K-12 metabolism during the initial phase of transition from an anaerobic to a micro-aerobic environment. *PLoS One* **6**: 1–7
- Turinsky AJ, Grundy FJ, Kim J-H, Chambliss GH & Henkin TM (1998) Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis* ackA promoter requires sequences upstream of the CcpA binding site. *J. Bacteriol.* **180**: 5961–5967
- Ujita S (1978) Fructose 1,6-bisphosphate aldolases from spores and vegetative cells of *Bacillus subtilis* PCI 219. *J. Biochem.* **83**: 493–502
- Vanderperre B, Bender T, Kunji ER & Martinou J-C (2015) Mitochondrial pyruvate import and its effects on homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.*: 35–41
- Vanderpool CK (2007) Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 146–151
- Viaene A, Dhaese P, Genetica L, Gent R, Ledeganckstraat KL & Gent B- (1989) Volume 17 Number 3 1989 Nucleic Acids Research Sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Bacillus subtilis* figure shows the nucleotide sequence of gap and the derived amino-acid sequence . The polypeptide is 80 % homologous (267 . **17**: 9000

- Voegele RT, Mitsch MJ & Finan TM (1999) Characterization of two members of a novel malic enzyme class. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1432**: 275–285
- Von Wachenfeldt C & Hederstedt L (2002) Respiratory cytochromes, other heme proteins, and heme biosynthesis. In *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*, Sonenshein AL Hoch JA & Losick R (eds) pp 163–179. ASM press
- Warner JB, Krom BP, Magni C, Konings N & Lolkema JS (2000) Catabolite repression and induction of the Mg²⁺ -citrate transporter CitM of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**: 6099–6105
- Warner JB, Magni C & Lolkema JS (2003) CcpA-independent regulation of expression of the Mg²⁺ -citrate transporter gene citM by arginine metabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**: 854–9 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=142827&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wei Y, Guffanti A a., Ito M & Krulwich T a. (2000) *Bacillus subtilis* YqkI is a novel malic/Na⁺-lactate antiporter that enhances growth on malate at low protonmotive force. *J. Biol. Chem.* **275**: 30287–30292
- Weitzman PDJ & Jaskowska-Hodges H (1982) Patterns of nucleotide utilisation in bacterial succinate thiokinases. *FEBS Lett.* **143**: 237–240
- Wieschalka S, Blombach B, Bott M & Eikmanns BJ (2012) Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Biotechnol.* **6**: 87–102
- Wolfe AJ (2005) The Acetate Switch. **69**: 12–50
- Yamaguchi M, Takechi K, Myouga F, Imura S, Sato H, Takio S, Shinozaki K & Takano H (2012) Loss of the plastid envelope protein AtLrgB causes spontaneous chlorotic cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **53**: 125–134
- Yamamoto H, Murata M & Sekiguchi J (2000) The CitST two-component system regulates the expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **37**: 898–912
- Yang Y, Jin H, Chen Y, Lin W, Wang C, Chen Z, Han N, Bian H, Zhu M & Wang J (2012) A chloroplast envelope membrane protein containing a putative LrgB domain related to the control of bacterial death and lysis is required for chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **193**: 81–95
- Zamboni N, Maaheimo H, Szyperski T, Hohmann HP & Sauer U (2004) The phosphoenolpyruvate carboxykinase also catalyzes C3 carboxylation at the interface of glycolysis and the TCA cycle of *Bacillus subtilis*. *Metab. Eng.* **6**: 277–284
- Zhu T, Lou Q, Wu Y, Hu J, Yu F & Qu D (2010) Impact of the *Staphylococcus epidermidis* LytSR two-component regulatory system on murein hydrolase activity, pyruvate utilization and global transcriptional profile. *BMC Microbiol.* **10**: 287

- Zorrilla S, Doan T, Alfonso C, Margeat E, Ortega A, Rivas G, Aymerich S, Royer C a & Declerck N (2007) Inducer-modulated cooperative binding of the tetrameric CggR repressor to operator DNA. *Biophys. J.* **92**: 3215–3227
- Zwickl P, Fabry S, Bogedain C, Haas a. & Hensel R (1990) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus woesei*: Characterization of the enzyme, cloning and sequencing of the gene, and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 4329–4338

Annexe

L'annexe contient l'article sous la forme de soumission demandé par le journal :
« Proceeding of the National Academy of Sciences », ainsi que les informations
supplémentaires.

The dual regulation of a novel pyruvate transporter ensures pyruvate homeostasis in *Bacillus subtilis*

Teddy Charbonnier¹, Dominique Le Coq^{1,2}, Olivier Delumeau¹, Magali Calabre¹, Stéphane Aymerich¹ and Matthieu Jules^{‡1}

¹ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France; ² Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Glucose and malate are the preferred carbon sources for *Bacillus subtilis* and impose a strict hierarchy in the use of alternative carbon sources via the catabolite repression. At the heart of the central carbon metabolism, pyruvate is a pivotal metabolite in all living cells. *B. subtilis* is able to use pyruvate as sole carbon source. We herein revealed that *ysbAB* (renamed in *pftAB*), the only operon specifically expressed in pyruvate-grown cells, encodes a membrane complex that operates as a novel family of facilitated transporters and corresponds to the major pyruvate transporter in *B. subtilis*. We then demonstrated that the previously uncharacterized LytST two-component system is responsible for the induction of *pftAB* in the presence of pyruvate by binding a palindromic region upstream *pftAB*. We showed that both glucose and malate trigger the CcpA-mediated catabolite repression of *pftAB*. However, an additional mechanism repressed *pftAB* in the presence of malate. We revealed that an active malic enzyme is required for this repression. We then demonstrated that the end-product of the malic enzyme reaction, *i.e.* intracellular pyruvate, triggers the malate-dependent, CcpA-independent catabolite repression of *pftAB* by hampering the LytST-mediated induction of *pftAB*. Overall, we evidence a complete system of sensors, feed-forward and feedback controllers that tightly manage pyruvate homeostasis.

Pyruvate transport | Homeostasis | *Bacillus subtilis* | CcpA

Introduction

Pyruvate is a key metabolite for living cells as the end-product of glycolysis, a major substrate for oxidative metabolism, and a branching point for glucose, lactate, acetate, fatty acid and amino acid synthesis. Because it is at the junction of several essential pathways in both eukaryotic and prokaryotic cells, a tight control of its homeostasis and fate is crucial to ensure cell structural stability and robustness to changing environmental growth conditions. In eukaryotes, the mitochondrial enzymes that metabolize pyruvate are physically separated from the cytosolic pyruvate pool and rely on a transport system to shuttle pyruvate across the inner mitochondrial membrane. This transport system consists of a hetero-oligomeric complex composed of carriers MPC1 and MPC2 (1-2). In prokaryotes, knowledge on pyruvate uptake systems is scarce. To date, two monocarboxylate transport systems with low affinity for pyruvate have been identified and characterized, MctC in *Corynebacterium glutamicum* (3) and MctP in *Rhizobium leguminosarum* (4). Although *Bacillus subtilis*, the model for the Gram-positive bacteria, is able to grow on pyruvate as sole carbon source (5), no clear homolog with any of the bacterial pyruvate transporters was found in its genome (6).

We recently analyzed the contribution of transcriptional regulation to metabolic flux adjustments in *B. subtilis* cells grown on two types of substrates, glycolytic (*e.g.* glucose) and gluconeogenic (*e.g.* malate) (5). The expression of the genes encoding the known transporters of gluconeogenic carbon sources were activated in the presence of only the cognate carbon source in the medium via two-component systems (TCSs; *e.g.* *maeN* by MalK/R (7)). The co-assimilation of carbon sources in bacteria is strictly controlled by the carbon catabolite repression (CCR). In *B. subtilis*,

glucose and malate are the two preferred carbon sources and therefore impose a strict hierarchy for the use of alternative carbon sources (8). At the transcriptional level, the glucose-mediated CCR operates via CcpA and its cofactors (HPr and Crh) to repress transcription of several targets, among which are the genes encoding the transporters of alternative carbon sources (9). We recently showed that malate represses the co-utilization of alternative, glycolytic substrates by hijacking the usual glucose-mediated CcpA-dependent catabolite repression mechanism (8-9). The carbon-specific gene regulatory networks together with the global mechanism of catabolite repression can be viewed as sensors, feed-forward and feedback controllers that tightly manage resource allocation and fluxes within cells and adapt the overall metabolism to their changing environment. In the present work, we identified the first bacterial transporter specific for pyruvate, we characterized its regulation and revealed that this system directly contributes to proper pyruvate homeostasis.

Results

The *B. subtilis* *ysbAB* (*pftAB*) operon encodes a membrane protein complex essential for growth on pyruvate. To identify genes coding the pyruvate uptake system of *B. subtilis*, we performed a comparative analysis of two transcriptome datasets corresponding to metabolically closely-related growth conditions, pyruvate (M9P) and succinate plus glutamate (M9SE) media (5). As shown on Figure 1A, the comparative analysis revealed that *ysbA* and *ysbB* were the only specifically induced genes in cells grown in M9P as compared to cells grown in M9SE. The *ysbA* and *ysbB* genes

Significance

Two-component systems (TCSs) are prevalent throughout the bacterial kingdom and commonly found in lower eukaryotes and plants. TCSs are composed of a sensor and a response regulator, and serve as stimulus-response coupling mechanisms that allow organisms to adapt to environmental changes. Due to their highly specific response towards a signal molecule, TCSs represent an attractive target for the rational design of novel nature-inspired sensors. We show that pyruvate acts as the signal molecule of the LytST TCS, which in turn induces expression of the PftAB pyruvate transporter. However when the pyruvate influx is high, LytST activity is drastically reduced. Such a retro-inhibition challenges the design of synthetic switches but undoubtedly offers new possibilities for the development of integrated sensor/controller circuitry.

Reserved for Publication Footnotes

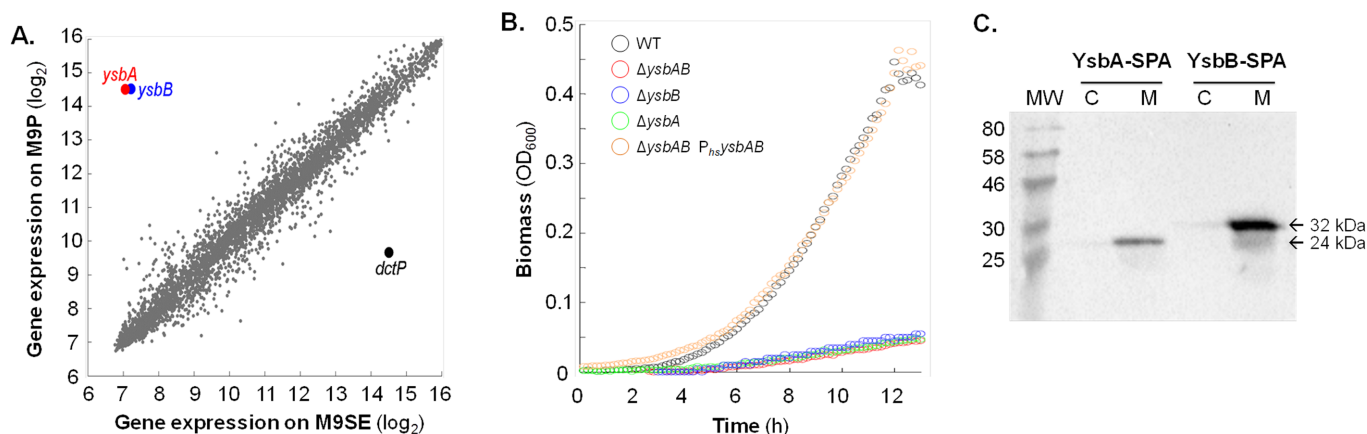


Fig. 1. Expression, role and localization of *ysbAB* (*pftAB*) during growth of *B. subtilis* cells on pyruvate. A. Comparative gene expression analysis (grey dots) between cells grown on pyruvate (M9P) versus succinate plus glutamate (M9SE). The *ysbA* (red dot) and *ysbB* (blue dot) genes are specifically expressed on M9P; the *dctP* (black dot) gene encoding the major C4-dicarboxylate permease is specifically expressed on M9SE. Data were extracted from (5, 10) and reanalyzed. B. Growth of the WT (black), $\Delta ysbA$ (green), $\Delta ysbB$ (blue), $\Delta ysbAB$ (red) and $\Delta ysbAB P_{hsbAB}$ (orange) strains on M9P. C. Cytoplasmic versus membrane localization of YsbA-SPA (24 kDa) and YsbB-SPA (32 kDa). Cells were grown in M9SE+P. Western-blot was performed using an anti-FLAG monoclonal antibody as primary antibody and HR-conjugated anti-mouse antibody as secondary. A representative experiment is presented on each panel.

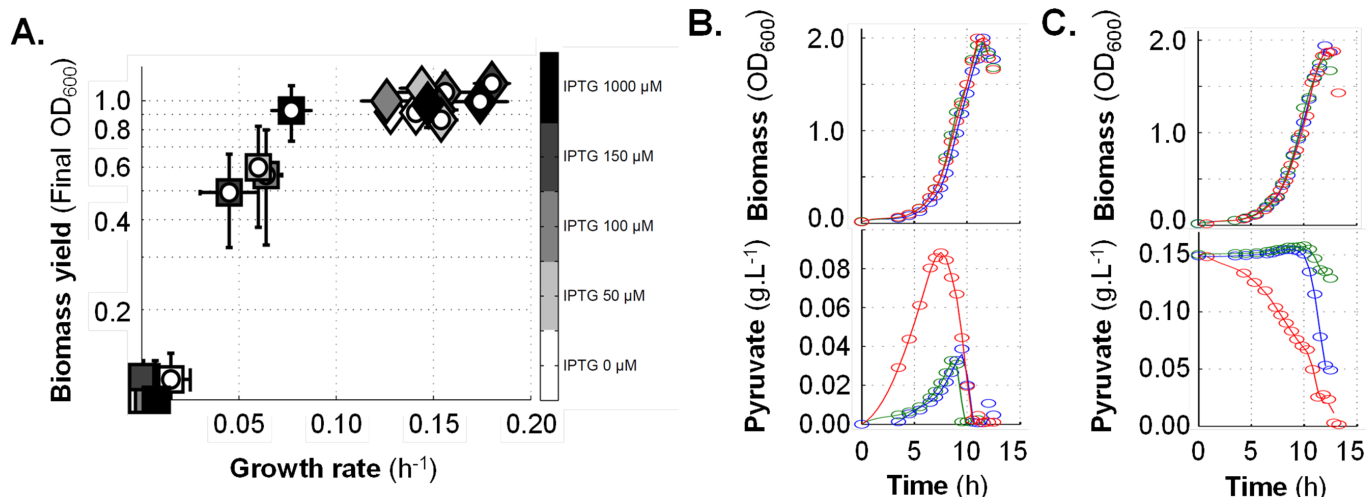


Fig. 2. Functional characterization of the YsbAB (PftAB) pyruvate transporter. A. Growth in MM1+pyruvate of the *C. glutamicum* WT (diamonds) and $\Delta mctC$ (squares) strains transformed with the empty pXJM19 (filled symbols) or pXJM19-*ysbAB* (white inset in symbols) plasmids. Expression of *ysbAB* was induced using different IPTG concentrations (grey color bar). Mean values of at least six independent experiments with standard deviations are presented. B. and C. Growth of the *B. subtilis* WT (blue), $\Delta ysbAB$ (green), and $\Delta ysbAB P_{hsbAB}$ (red) strains and corresponding concentrations of extracellular pyruvate. Only a representative experiment is shown. B. Cells were grown in M9G with 200 μ M IPTG. C. Cells were grown in M9G with 200 μ M IPTG and 0.15 $g \cdot L^{-1}$ pyruvate.

Table 1. Induction of *pftAB* by the LytST TCS.

Genotype ^a	<i>P_{pftAB}</i> expression (U. OD_{600}^{-1}) ^b	
	M9SE	M9SE+P
WT	0.2 \pm 0.3	4.4 \pm 0.2
$\Delta lytST$	0.7 \pm 0.5	0.3 \pm 0.4
<i>P_{pftAB}</i> - $\Delta lytT1$	0.1 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2
<i>P_{pftAB}</i> - $\Delta lytT2$	0.2 \pm 0.3	0.4 \pm 0.1
<i>P_{pftAB}</i> - $\Delta lytT1-2$	0.5 \pm 0.7	0.4 \pm 0.3

^a The two deleted LytT binding sites are described in Figure S3.

^b Mean values of at least 6 replicates with standard deviations.

are transcribed as an operonic structure (10). In order to check whether *ysbA* and/or *ysbB* are essential for growth of *B. subtilis* on pyruvate, we constructed single and double KO mutant strains (Table S1). To avoid polar effect of *ysbA* KO on the expression of *ysbB*, we reinserted upstream *ysbB* the native *P_{ysbA}* promoter sequence (Table S1). The deletion of either *ysbA*, *ysbB* or *ysbAB*

resulted in loss of the ability to grow in M9P (Figure 1B). These strains did not show any phenotype different from the wild-type (WT) strain when grown on other substrates (e.g. glucose, M9G; malate, M9M; and M9SE; Table S2). Complementation by an IPTG-inducible *ysbAB* cassette (*P_{hsbAB}*) inserted at the *amyE* locus restored growth on M9P (Figure 1B, Table S2) to the WT level (0.25 h^{-1}).

Both YsbA and YsbB were predicted to be membrane proteins (Figure S1A). To validate their localization, we used *B. subtilis* cells expressing SPA-tagged YsbA and YsbB and analyzed samples corresponding to the cytosolic and membrane fractions by western-blot using anti-FLAG antibodies. The results showed that both YsbA-SPA and YsbB-SPA were mainly present in the membrane fraction (Figure 1C). We next asked whether YsbA and YsbB form a protein complex in the membrane. We performed tandem affinity purification (TAP) using the SPA-tagged YsbA and YsbB expressing strains and appropriate control strains (SI). Strains were grown in M9P and the purified (YsbA-SPA and YsbB-SPA) and co-purified proteins were identified using mass spectrometry after tryptic or tryptic/chymotryptic digestions. We

Table 2. CcpA-dependent and independent catabolite repressions of *pftAB*.

Genotype	P_{pftAB} expression (U.OD ₆₀₀ ⁻¹) ^a		M9P	M9P+G	M9P+M
	M9G	M9M			
WT	<0.1	0.6 ± 0.1	4.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2
$\Delta ccpA$	<0.1	0.3 ± 0.2	4.8 ± 0.2	3.5 ± 0.5	0.4 ± 0.1
<i>ptsH1</i>	<0.1	0.5 ± 0.2	4.9 ± 0.6	<0.1	0.9 ± 0.2
Δcrh	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1	5.3 ± 0.6	<0.1	1.0 ± 0.2
<i>ptsH1</i> Δcrh	<0.1	0.2 ± 0.1	4.8 ± 0.5	2.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1
$\Delta ccpA$ $\Delta maeA$	-	-	4.9 ± 0.2	-	4.8 ± 0.5
$\Delta ccpA$ $\Delta ywkB$	-	-	4.9 ± 0.6	-	0.6 ± 0.1
$\Delta ccpA$ $\Delta maeA$ $P_{hs}malS$	-	-	4.4 ± 0.4	-	3.7 ± 0.3
$\Delta ccpA$ $\Delta maeA$ $P_{hs}malS$ +I ^b	-	-	5.2 ± 0.4	-	0.4 ± 0.2

^a Mean values of at least 6 replicates with standard deviations. '-' not determined.

^b I: Inducer. Overexpression of *malS* was carried out using 200 μ M IPTG.

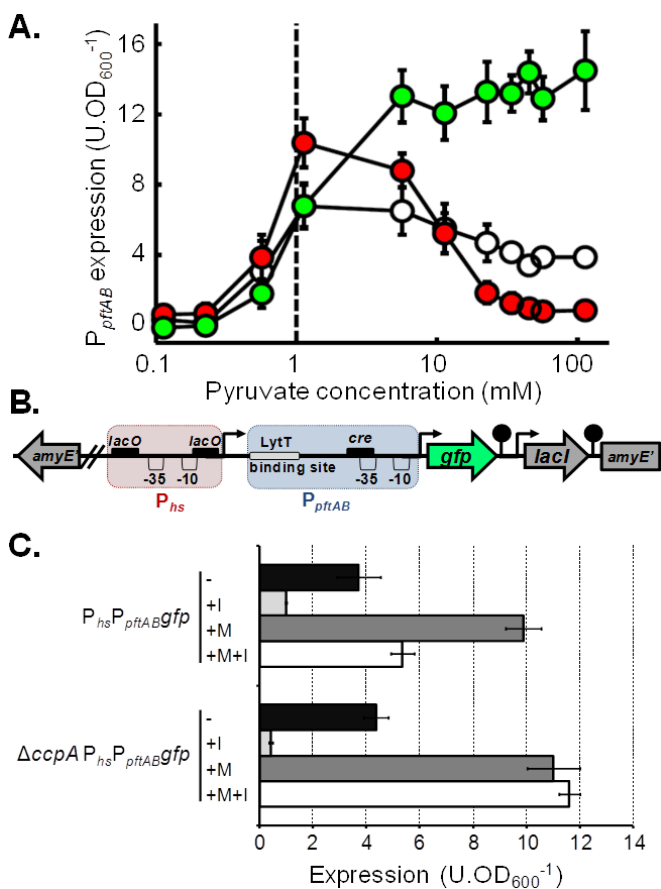
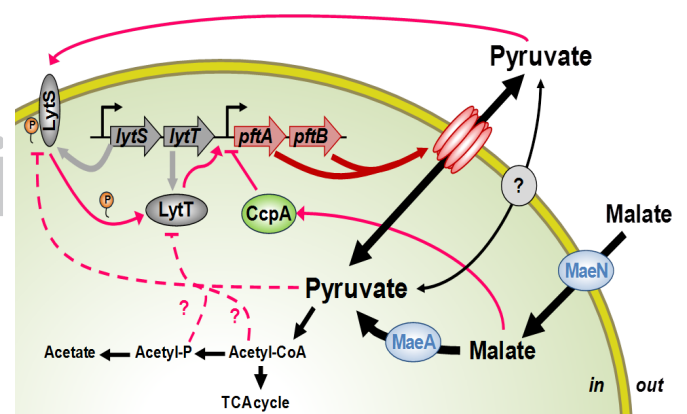


Fig. 3. Pyruvate influx tightly controls *pftAB* expression. A. Expression of *pftAB* in the WT (white), $\Delta pftAB$ (red) and $P_{hs}pftAB$ (green, 1 mM IPTG) strains grown in M9SE plus pyruvate (at concentrations ranging from ~0.1 to ~100 mM). The dashed line represents the estimated K_M of PftAB. B. Genomic structure of the $P_{hs}P_{pftAB}gfp$ at the *amyE* locus. The red and blue boxes represent P_{hs} and P_{pftAB} , respectively. Black boxes indicate DNA binding sites: *cre* for CcpA and *lacO* for LacI. C. Expression of $P_{hs}P_{pftAB}gfp$ in the WT and $\Delta ccpA$ strains grown in M9SE+P±M±I (I: 200 μ M IPTG). Mean values of at least six experiments with standard deviations are presented on panels A and C.

were unable to detect YsbA in the tandem affinity-purified sample containing SPA-tagged YsbB, most probably due to the fact that the trypsin and trypsin/chymotrypsin digestions of YsbA only generates poorly detectable peptides (as predicted by *in silico* digestion). However, YsbB was specifically detected in the sample containing SPA-tagged YsbA (Figure S1B). Altogether,



our results strongly suggested that YsbA and YsbB form a hetero-oligomeric membrane complex.

The YsbAB (PftAB) membrane complex operates as a facilitated transporter of pyruvate. We asked whether *ysbAB* encodes a pyruvate uptake system. To this end, we tested for functional complementation of the *C. glutamicum mctC* mutant (deficient for growth on pyruvate, (3)) using an IPTG-inducible *ysbAB* expression plasmid. The expression of *ysbAB* was induced using IPTG at low (50 μ M), intermediate (100 and 150 μ M) and high (1 mM) concentrations. As shown on Figure 2A, the *mctC* mutant transformed with the empty plasmid was unable to grow on pyruvate as sole carbon source. However, the IPTG-inducible expression of *ysbAB* was able to partially restore growth of the *mctC* mutant. At low and intermediate levels of *ysbAB* induction (50, 100 and 150 μ M IPTG), the biomass reached an OD₆₀₀ up to ~0.6 unit and the rates of growth were comprised between 0.04 and 0.06 h⁻¹. At high induction level (1mM IPTG), the biomass reached an OD₆₀₀ of ~0.9 and the growth rate was of ~0.08 ± 0.01 h⁻¹ (in comparison with an OD₆₀₀ of ~1 and a growth rate of ~0.15 h⁻¹ for the control strain). These results indicated that *ysbAB* encode a pyruvate transport system.

We next determined whether YsbAB operates as an active or passive pyruvate transport system. A straightforward approach to experimentally address this issue is to evaluate whether the YsbAB complex transports pyruvate along or against the concentration gradient of pyruvate. We first verified if YsbAB could export intracellular pyruvate into the growth medium in the absence of extracellular pyruvate. It is well-known that during growth on glucose or malate, *B. subtilis* cells excrete pyruvate prior its (re)assimilation when the carbon source is depleted (5, 11). We thus quantified the extracellular pyruvate concentrations during growth in M9G of the WT, $\Delta ysbAB$ and $P_{hsybsAB}$ strains. The three strains exhibited identical growth phenotype (Figure 2B). The pyruvate concentration measured in the growth medium of the WT and $\Delta ysbAB$ strains steadily increased until the late exponential phase to about 0.03 g.L^{-1} ($\sim 0.34 \text{ mM}$) with a specific production rate (q_{pyr}) of $\sim 0.5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$. Afterwards, the pyruvate concentration dropped to zero, which suggests that cells rapidly used pyruvate before entering stationary phase. For the IPTG-inducible *ysbAB* expression strain, the pyruvate concentration culminated at $\sim 0.09 \text{ g.L}^{-1}$ ($\sim 1.02 \text{ mM}$) after seven hours of culture (Figure 2B). The specific production rate of pyruvate (q_{pyr}) peaked at $\sim 5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$ after four hours of culture and quickly decreased thereafter. The specific glucose consumption and specific acetate and citrate production rates did not show any differences between the three strains (Figure S2C, D, E). These results indicated that YsbAB can efficiently export pyruvate, and that there exists at least another pyruvate transport system allowing the import and export of pyruvate.

The intracellular concentration of pyruvate of *B. subtilis* cells grown in glucose minimal medium is about 1 mM (12), which suggests that the gradient of pyruvate drove the YsbAB-mediated pyruvate export till extracellular and intracellular pyruvate concentrations reached an equilibrium. To verify this assumption, we cultivated the very same strains in M9G with 0.15 g.L^{-1} ($\sim 1.70 \text{ mM}$) of pyruvate (Figure 2C). In this experiment, the concentration of pyruvate is slightly higher than the extracellular concentration resulting from the export of pyruvate by *ysbAB* overexpressing cells (as observed on Figure 2B) and higher than the intracellular pyruvate concentration of WT cells grown in M9G. As shown on Figure 2C, the concentration of pyruvate measured in the growth medium of the WT strain showed a slight increase till ten hours of culture followed by a drop as soon as cells entered stationary phase. Interestingly, this drop coincided with the induction of *ysbAB* when glucose was depleted (see next paragraphs). Consistently, in the $\Delta ysbAB$ strain the pyruvate consumption was delayed and strongly reduced. However, in the IPTG-inducible *ysbAB* expression strain, the extracellular pyruvate concentration dropped from the beginning of the culture to reach zero before the entry into stationary phase (Figure 2C). The specific glucose consumption and specific acetate and citrate production rates did not show any differences between the three strains (Figure S2H, I, J). Making use of a simple model of facilitated transport and of the growth conditions described above (SI and Table S3), we estimated that the YsbAB complex had a maximum rate (J_{max}) of about $10.0 \pm 1.0 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$ and an apparent affinity constant for pyruvate (K_M) of about $1.0 \pm 0.1 \text{ mmol.L}^{-1}$. Altogether, these results demonstrated that YsbAB primarily mediated the import of pyruvate in the presence of extracellular pyruvate. We therefore renamed *ysbAB* in *pftAB* for pyruvate facilitated transporter.

The LytST TCS induces *pftAB* expression in the presence of pyruvate. Since PftAB can import and export pyruvate, its expression must be tightly regulated to ensure proper pyruvate homeostasis. Two genes, *lytS* and *lytT*, encoding for a putative TCS (6) are located immediately upstream from *pftAB* on the *B. subtilis* chromosome (Figure S3A). They are weakly but con-

stitutively expressed in exponential growth conditions and transcribed as an operonic structure (10). We questioned whether this operon is involved in pyruvate utilization and constructed the $\Delta lytST$ strain (Table S1). The $\Delta lytST$ strain was unable to grow on pyruvate and no growth defect was observed when replacing pyruvate by other substrates (Table S2). To verify whether LytST is responsible for the induction of *pftAB* in the presence of pyruvate, we constructed a *gfp* transcriptional fusion reporting the promoter activity of *pftAB* ($P_{pftABgfp}$) and inserted it at the *pftAB* locus in both the $\Delta lytST$ and WT strains (Table S1; Figure S3B). Because the $\Delta lytST$ strain does not grow in M9P, cells were grown in M9SE \pm P. The GFP abundance was of $\sim 4.5 \text{ U.O.D}_{600}^{-1}$ for WT cells grown in M9SE+P and barely detectable in M9SE (Table 1). By contrast, the GFP abundance was of $\sim 0.5 \text{ U.O.D}_{600}^{-1}$ for the $\Delta lytST$ strain in both conditions (Table 1), which indicated that LytST is involved in the induction of *pftAB* expression. Performing *in silico* comparative-genomic analysis, Leyn *et al.* recently proposed putative binding sites for a series of TCSs of unknown functions (13). Based on these predictions, LytT may bind a DNA sequence located upstream of the *pftAB* promoter and composed of two boxes of 12 nucleotides separated by 9 nucleotides (Figure S3B). We constructed *gfp* transcriptional fusions with the *pftAB* promoter mutated for the two putative boxes either independently or together. The GFP abundance from the three reporter strains grown in M9SE+P dropped as much as in the $\Delta lytST$ strain (Table 1). Altogether, these results prompted us to conclude that each of the two predicted boxes is essential for the induction of *pftAB* by the LytST TCS.

Malate represses transcription of *pftAB* by a malic enzyme-dependent but CcpA-independent mechanism. To verify whether *pftAB* expression is under the control of the CcpA-dependent catabolite repression, we quantified the $P_{pftABgfp}$ expression level in the WT, $\Delta ccpA$, $\Delta ptsH1$, Δcrh and $\Delta ptsH1 \Delta crh$ strains under inductive or repressive conditions (Table 2). The deletion of *ccpA* fully relieved the glucose-mediated repression of *pftAB* in M9P+G, which is consistent with the presence of a putative *cre* box overlapping the -35 region of the promoter (Figure S3A). As expected, the glucose-mediated repression of *pftAB* was maintained in the $\Delta ptsH1$ and Δcrh single mutant strains, which confirmed that the two co-factors can functionally replace each other (Table 2). Consistently, the glucose-mediated *pftAB* repression was significantly reduced in the $\Delta ptsH1 \Delta crh$ double mutant. Unexpectedly however, the malate-mediated repression was not relieved in the $\Delta ccpA$ mutant nor in any of the $\Delta ccpA$, $\Delta ptsH1$, Δcrh and $\Delta ptsH1 \Delta crh$ mutants (M9P+M medium, Table 2). Glucose thus repressed transcription of *pftAB* via CcpA and its cofactors while malate repressed *pftAB* transcription by at least one CcpA-independent mechanism.

To identify this CcpA-independent catabolite repression system, a mini-Tn10 insertion library was constructed from a *B. subtilis* *pftAB* reporter strain in a $\Delta ccpA$ background. This library was then screened on plates for *pftAB* derepression in the presence of malate. Thirteen positive clones from six independent pools of transposants were isolated and further characterized (Figure S4). Most of the clones with strong *pftAB* derepression were mutated in the TCS *malK/R* and its regulon involved in malate transport (*maeN*) and utilization (*maeA*) (7, 14). As *maeA* is the first gene of the *maeA-ywkB* operon, a possible role of *ywkB* could not be excluded. We thus analyzed the effect of the deletion of each gene. The inactivation of *maeA* fully relieved *pftAB* expression in M9P+M, while the inactivation of *ywkB* had no significant effect (Table 2). These results showed that the CcpA-independent malate-dependent repression requires *maeA*.

B. subtilis possesses four paralogous malic enzymes: YtsJ, a NADP-dependent malate dehydrogenase, plays the major role in malate utilization, whereas MaeA, MalS and MleA are NAD-dependent and are dispensable for growth on malate (15). In

order to test whether the MaeA protein itself or the NAD-dependent malic enzyme activity was required for the malate-dependent CcpA-independent catabolite repression of *pftAB*, we replaced MaeA by another NAD-dependent malic enzyme. The overexpression of *malS* in a Δ *maeA* strain restored repression of *pftAB* up to the WT level (Table 2). Altogether our results indicated that the NAD-dependent malic enzyme activity but not the MaeA protein is essential to drive the malate-dependent CcpA-independent repression of *pftAB*.

Intracellular pyruvate hinders the extracellular pyruvate-dependent induction of *pftAB* by LytST. The NAD-dependent malic enzyme MaeA catalyzes the transformation of malate into pyruvate (5). This prompted us to hypothesize that the end-product of the reaction (*i.e.* intracellular pyruvate) is mediating the CcpA-independent catabolite repression. To test this hypothesis, we altered the concentration of intracellular pyruvate in the absence of extracellular malate by two complementary means making use of the kinetic properties of the PftAB transport system. $P_{pftAB}gfp$ reporter cells were grown in M9SE supplemented with different concentrations of pyruvate and the rate of pyruvate uptake was controlled by modulating the level of PftAB (using the WT, Δ *pftAB* and $P_{hs}pftAB$ strains; Figure 3A). The Δ *pftAB* strain cannot uptake pyruvate and has supposedly less intracellular pyruvate than a strain expressing *pftAB*. We thus expected the P_{pftAB} activity to be lower in the WT and $P_{hs}pftAB$ strains than in the Δ *pftAB* mutant if the intracellular pyruvate concentration negatively affected *pftAB* expression. GFP abundances in the WT and Δ *pftAB* strains were similar for extracellular pyruvate concentrations below 1mM. For higher extracellular pyruvate concentrations, GFP abundance increased up to 14 U.OD₆₀₀⁻¹ in the Δ *pftAB* strain but slowly decreased down to 4 U.OD₆₀₀⁻¹ in the WT. Remarkably, GFP abundance in the IPTG-induced $P_{hs}pftAB$ strain peaked at ~11 U.OD₆₀₀⁻¹ for an extracellular pyruvate concentration of about 1mM and dropped afterwards down to ~1 U.OD₆₀₀⁻¹ (Figure 3A). These results indicated that, although extracellular pyruvate triggered the induction of *pftAB*, this induction is strongly inhibited (14-fold between the Δ *pftAB* and $P_{hs}pftAB$ strains) by the activity of PftAB, *i.e.* by pyruvate uptake and increasing intracellular pyruvate concentration. It is worth to note that this feedback regulation led to a repression of *pftAB* of ~90%, similar to the repression exerted in the presence of malate. Taken together, our results suggested that the malate-dependent, CcpA-independent catabolite repression of *pftAB* only resulted from the increase of intracellular pyruvate via the strong malate-dependent induction of MaeA.

No other DNA-binding regulatory protein than MalR was identified by our transposon mutagenesis. We therefore wondered whether the CcpA-independent repression of *pftAB* was mediated by the LytST TCS itself, *i.e.* by reducing its induction activity. In order to verify this assumption, we constructed a synthetic fusion combining the IPTG-inducible P_{hs} with the native P_{pftAB} upstream of the *gfp* gene ($P_{hs}P_{pftAB}gfp$, Figure 3B). If the CcpA-independent catabolite repression of *pftAB* is mediated by LytST, the expression of this reporter system will be fully relieved in the presence of IPTG. By contrast, if it is mediated by an unknown DNA-binding regulator acting on or downstream of P_{pftAB} , the expression from the upstream P_{hs} should be hindered by this regulator acting as a roadblock. As shown on Figure 3C, the $P_{hs}P_{pftAB}gfp$ synthetic construct in the WT genetic background maintained the repression observed in the presence of malate with or without IPTG. However in the Δ *ccpA* mutant, while the malate-mediated CcpA-independent repression of *pftAB* was maintained in the absence of IPTG, the *pftAB* repression was fully relieved in the presence of IPTG (Figure 3C). This experiment revealed that CcpA repressed *pftAB* expression in the presence of malate by binding on the downstream *pftAB* promoter and acting as a roadblock on the transcribing RNA polymerase for

the P_{hs} (Figure 3B). These results also demonstrated that there is no other DNA-binding protein that specifically repressed *pftAB* in the presence of malate. As a consequence, we concluded that the CcpA-independent *pftAB* repression corresponded to a lower level of induction of *pftAB* by LytST, hence revealing an opposite transcriptional control to ensure pyruvate homeostasis.

Discussion

In this study, we have shown that the homeostasis of the pivotal metabolite pyruvate is controlled in *B. subtilis* not only by the central carbon metabolic fluxes but also by a novel import/export system, the expression of which is regulated in response to both external and internal pyruvate concentrations. This novel bacterial transport system consists in a hetero-oligomeric complex composed of PftA and PftB which operates as a pyruvate-specific facilitated transporter. In the presence of extracellular pyruvate, the *pftAB* operon is induced by the TCS LytST (previously of unknown function). As for the transporters of alternative substrates, *pftAB* expression is repressed by the CcpA-dependent catabolite repression when a preferred carbon source, glucose or malate, is present in the medium. We also discovered that the LytST-dependent induction of *pftAB* is reduced by increasing concentrations of intracellular pyruvate. Hence, LytST is responding to both extracellular and intracellular pyruvate and constitutes, together with the transporter PftAB, an original regulatory system ensuring pyruvate homeostasis in *B. subtilis*.

It was recently shown in *B. subtilis* forming biofilms that *pftAB* is induced in the presence of extracellular acetate (16). When we added acetate to the medium, we observed no induction of *pftAB* in exponentially growing cells. We however observed a weak, dose-dependent induction when cells reached the stationary phase after growth in repressive conditions (data not shown). A reasonable hypothesis is that the reduction of the acetate export consequent to the presence of extracellular acetate led to an overflow metabolic shift towards an increase of pyruvate export. Indeed, it is well-known that when the intracellular pyruvate pool is high, the overflow metabolism, in particular pyruvate export, is stimulated (5). We showed that pyruvate export during exponential growth on glucose is independent from PftAB which is kept under the control of the catabolite repression (Figure 4). Hence, at the onset of the stationary phase when the CcpA-dependent repression is relieved, the exported pyruvate triggered *pftAB* induction in a dose-dependent manner.

The *pftA* and *pftB* genes were originally annotated as encoding homologs of the *Staphylococcus aureus* LrgA and LrgB membrane proteins (6). The molecular mechanisms controlling death and lysis during biofilm development of *S. aureus* are organized around the CidR-regulated *cidABC* and LytSR-regulated *lrgAB* operons. *cidA* and *lrgA* encode proteins that are believed to function as holin and antiholin, respectively, while *cidB* and *lrgB* are of unknown function (17). Although PftA and PftB share strong homologies with holin/antiholin systems, the finding that these proteins belong to a new class of effective bacterial transporters is consistent with the recent discovery of the chloroplastidic glycolate/glycerate transporter, PLGG1, that most likely evolved from a gene fusion of bacterial *lrgA* (*pftA*) and *lrgB* (*pftB*) homologs (18-19). Also consistent with our findings in *B. subtilis*, an impaired ability to utilize pyruvate was observed in the *lytST*-like *lytSR* mutant of *S. epidermidis* (20). In addition, it was recently shown in the evolutionary distant bacterium *Escherichia coli* that the LytST-like YpdAB TCS is weakly activated by pyruvate (21-22). Remarkably, the YpdB binding site is similar to the *B. subtilis* LytT binding site (Figure S3). However, in *S. aureus* it was proposed that LytSR senses decrease in membrane potential and responds by inducing *lrgAB* transcription. It was also proposed that a primary intermediate of overflow metabolism, acetyl phosphate (acetyl-P), already shown to act as a small phosphodonator to

response regulators (23), directly activates LytR in an alternative signaling pathway (17). Our data, however, demonstrated that the higher the pyruvate influx the lower the induction level of *pftAB* is (Figure 3A). This finding argues in favor of a negative feedback regulation by the level of intracellular pyruvate (Figure 4). Besides, we observed no induction of *pftAB* in either the WT or the Δ *ccpA* strains in conditions that are known to give rise to elevated concentrations of the intermediates of overflow metabolism and high acetate excretion rates (5, 11). Hence, if acetyl-P acts as a phosphate donor to LytT in *B. subtilis*, it does not result in its activation as it has been proposed for *S. aureus* LytR. Overall, there are undeniable similarities in gene sequences and signaling between the homologous *Staphylococci* LytSR, *E. coli* YpdAB and *B. subtilis* LytST TCSs but also significant physiological and functional divergences, which are likely to be related to niche-specific evolutionary constraints.

Unpredictable changing environments necessitate appropriate responses for successful bacterial adaptation. Appropriate growth strategies rely on sensing systems that globally adjust gene expression via transcription factors mediated feed-forward and feedback regulations. In particular, bacterial TCS combine a sensor (*i.e.* the sensor kinase) with a feed-forward controller (*i.e.* the response regulator) to induce expression of target genes involved in the adaptation process. The *pftAB* expression levels in response to different pyruvate concentrations (Figure 3A) revealed the existence of an additional feedback control acting on LytST. To get insight into the molecular mechanism that governed the opposed, feed-forward and feedback LytST-mediated regulation of *pftAB* by extracellular and intracellular pyruvate, we developed a simple model of gene expression and explored competitive, non-competitive and uncompetitive inhibitions of LytT activation by intracellular pyruvate (SI). We only assumed that the LytT regulatory protein binds onto the *pftAB* promoter as a homodimer upon phosphorylation by LytS, which can be well represented by a Hill equation (24). The model simulations perfectly mimicked the induction of the *pftAB* promoter in the Δ *pftAB* strain (Figure S5). However, we were unable to identify biologically-relevant model parameters that entirely represented *pftAB* induction in the other genetic backgrounds. Different other molecular mechanisms may explain the feed-back regulation of LytST by intracellular pyruvate (and/or an intermediate of overflow metabolism), such as an inhibition of LytS autophosphorylation or a hindered recruitment of the RNA polymerase (Figure 4). To decide between these mechanisms and verify to which extend they apply to other TCSs, biochemical characterization of the transduction signal *in vitro* as well as structural analysis must be performed.

In conclusion, the influx and efflux of pyruvate from exponential to stationary growth phases resulted from the timely (re)routing of the central carbon metabolic fluxes and of the dynamics of the intermediate concentrations. Hence, the intracellular and extracellular sensor systems and the feed-forward and feedback regulations of pyruvate uptake ensured with respect to cell adaptation a tight management of pyruvate homeostasis.

Materials and Methods

Media and bacterial strains. *E. coli* DH5 α and TG1 were used for plasmid construction and transformation using standard techniques (25). *B. subtilis* and *C. glutamicum* strains used in this study are listed in Table S1. *B. subtilis* strains derived from BSB168, a *trp*⁺ derivative of *B. subtilis* 168 (10-11). For other experiments, *B. subtilis* was grown in a modified M9 medium (SI) and when necessary supplemented with 25 mg.L⁻¹ isoleucine, 50 mg.L⁻¹ leucine, 40 mg.L⁻¹ valine, 20 mg.L⁻¹ methionine and 4 g.L⁻¹ glutamate (26). *C. glutamicum* was grown in MM1 minimal medium (3). Carbon sources were used at concentrations of 3 g.L⁻¹ glucose, 5 g.L⁻¹ malate, 4 g.L⁻¹ succinate + 4 g.L⁻¹ glutamate, or 6 g.L⁻¹ pyruvate. When required, media were supplemented with antibiotics (SI).

Gene deletion. Deletions of *pftA* (*ysbA*), *pftB* (*ysbB*), *pftAB* (*ysbAB*) and *lytST* were performed by sequence replacement with a chloramphenicol resistance cassette (*cm*^R) expressed under the control of a constitutive promoter. The *cm*^R was PCR amplified from plasmid pDG1661 using primers

containing either a *Clal*, *SmaI* or *XbaI* restriction site (Table S4). PCR products were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, Madison, WI, USA) and then digested by the proper restriction enzymes. Regions containing *pftA*, *pftB*, *pftAB* and *lytST* were PCR amplified from genomic DNA using primers listed in Table S4. PCR products were purified and sub-cloned into the pGEM[®]-T Easy Vector according to the supplier's protocol. Reverse PCR were performed on the resulting plasmids using primers containing either the *Clal*, *SmaI* or *XbaI* restriction sites (Table S4). After purification and digestion, PCR products were ligated to the corresponding *cm*^R-containing PCR product.

Inducible gene expression. IPTG-inducible expression of *lytST* was performed by fusing *lytST* to the P_{spac} promoter from pMUTIN4 using *Bam*HI and *Sac*I restriction sites, followed by the single crossover integration of the resulting plasmid upstream *pftAB* in the Δ *lytST* strain. IPTG-inducible expression of *malS* and *pftAB* were carried out by fusing these genes to the P_{hs} promoter using the plasmids pDR111 (kind gift of David Rudner), pDG1661 and pDG1664 (27). Briefly, PCR-amplified fragments (Table S4) of *pftAB* and *malS* were cloned into the pDR111 by *Sal*I / *Nhe*I leading to pDR111-P_{hs}*pftAB* and by *Sal*I / *Sph*I leading to pDR111-P_{hs}*malS*. A PCR on pDG1664 was performed to introduce a *Not*I restriction site using appropriate primers (Table S4). The P_{hs}*pftAB* from pDR111-P_{hs}*pftAB* was then cloned into pDG1664-*Not*I using *Bam*HI and *Not*I. The spectinomycin resistance cassette (*spec*^R) of pDR111-P_{hs}*malS* was replaced by *cm*^R from pDG1661 using *Eco*RI and *Sac*I. The pDR111, pDG1661 and pDG1664-derivative plasmids were inserted by double crossover at the *amyE* and *thrB* loci, respectively. IPTG-inducible expression of *pftAB* for complementation of the *C. glutamicum* *mctC* mutant was performed by inserting *pftAB* in the pXmj19 plasmid (kind gift of Gerd Seibold) using *Sma*I and *Sal*I restriction sites.

Promoter and SPA-tag fusions. Fusion of the P_{*pftAB*} promoter with *lacZ* (for transposon mutagenesis) was constructed using the plasmid pDG1661 and the PCR-amplified P_{*pftAB*} using appropriate primers (Table S4). The PCR fragment was inserted by *Hind*III / *Bam*HI restriction/ligation. Fusion of P_{*pftAB*} with the *gfpmut3* gene was carried out by ligation-independent cloning using the pBSBII plasmid (Table S4, SI). Reverse PCR on the pBSBII-P_{*pftAB*} plasmid using proper primers (Table S4) was used to substitute parts or all of the LytT binding site from the promoter region of *pftAB* by *Bam*HI. The pBSBII-derivative plasmids were inserted at the *pftAB* locus by single crossover. Fusion of the P_{hs} and P_{*pftAB*} promoters upstream *gfpmut3* was performed by PCR-amplification of the P_{*pftAB*}*gfp*-containing region from the pBSBII-P_{*pftAB*} using appropriate primers (Table S4) and subsequent insertion downstream of P_{hs} into pDR111. The resulting plasmid was integrated by double crossover at the *amyE* locus, which led to the P_{hs}P_{*pftAB*}*gfp* transcriptional fusion. Fusion of the SPA sequence at the 3' end of either *pftA* or *pftB* was performed using the pMUTIN-LICSPA plasmid (SI) and the appropriate primers (Table S4).

Transposon mutagenesis. The mini-Tn10 delivery vector pIC333 was used for transposon mutagenesis as previously described ((28), SI). This plasmid was introduced into TC64 (Table S1) at 25°C using erythromycin selection. Single transformants were used to inoculate independent cultures at 25°C in LB + spectinomycin. In early exponential growth, the temperature was shifted to 40°C and cultures were continued for 4 more hours. Appropriate culture dilutions were spread on solid M9P+M + spectinomycin and 0.04% X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside), and incubated at 25°C to screen for clones with derepressed P_{*pftAB*}*lacZ* expression (blue colonies). Thirteen clones from independent pools of transposants were isolated in which the *lacZ* gene was expressed on M9P+M (Figure S4). These clones were selected for back-cross experiments and genes inactivated by the transposon were identified by target rescue and sequencing.

Live Cell Array and fluorescence analysis. Experiments and analyses were performed as previously described ((11), SI). Cells were grown in 96-well plates (CELLSTAR[®], Greiner bio-one) and incubated at 37°C under constant shaking in a Synergy[™] II microplate reader (BioTek[®]). OD₆₀₀ and fluorescence were measured every 10 minutes. Each culture was performed in at least three technical replicates by two biological replicates (>6 values). GFP concentration was expressed as unit per OD₆₀₀; 1 unit being equivalent to 1 pM of fluorescein (Figure S6).

Protein localization and quantitative SPA-Tag pull-down assays. Each SPA-tagged strain was pre-cultured overnight in the presence of erythromycin at 37°C. The culture was initiated by a 500-fold dilution (to an OD₆₀₀ of 0.001) in 2-liter M9SE+P. When OD₆₀₀ reached 0.3, cultures were centrifuged at 3000g for 10 minutes at 4°C. The pellet was re-suspended in 50 ml of cold buffer (10mM Tris-Cl, 150mM NaCl pH 8) and instantly frozen in liquid nitrogen. Cells were disrupted using a French Press. Membrane and cytosolic fractions were separated by ultracentrifugation at 100000g for 1 h. The membrane pellet was solubilized using buffer A supplemented with 1% DDM. Protein concentrations were measured by the Bradford method and identical protein amounts of the two fractions were loaded on 10% SDS-PAGE for Western-blot using anti-FLAG antibodies. Besides, protein complexes from the membrane fraction were pulled down using a sequential peptide affinity (SPA) purification method (29), and then separated by native PAGE and analyzed by nanoLC-MS/MS (SI).

Physiological parameters. Extracellular substrates and byproducts concentrations were measured by HPLC using a Dionex UltiMate[®] 3000 RSLC systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Sugars

were detected with a refractive index detector and organic acids with an UV/Vis detector. Substrate or product yields were calculated by linear regression of external concentration against biomass, and specific rates were calculated as yield multiplied by the growth rate. At least ten time points during the exponential growth phase were used for the regression analysis.

Acknowledgement.

- Herzig S, *et al.* (2012) Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* 337(6090):93-96.
- Bricker DK, *et al.* (2012) A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science* 337(6090):96-100.
- Jolkver E, *et al.* (2009) Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 191(3):940-948.
- Hosie AH, Allaway D, & Poole PS (2002) A monocarboxylate permease of *Rhizobium leguminosarum* is the first member of a new subfamily of transporters. *J Bacteriol* 184(19):5436-5448.
- Chubukov V, *et al.* (2013) Transcriptional regulation is insufficient to explain substrate-induced flux changes in *Bacillus subtilis*. *Mol Syst Biol* 9:709.
- Kunst F, *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390(6657):249-256.
- Tanaka K, Kobayashi K, & Ogasawara N (2003) The *Bacillus subtilis* YufLM two-component system regulates the expression of the malate transporters MaeN (YufR) and YfIS, and is essential for utilization of malate in minimal medium. *Microbiology* 149(Pt 9):2317-2329.
- Kleijn RJ, *et al.* (2010) Metabolic fluxes during strong carbon catabolite repression by malate in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 285(3):1587-1596.
- Meyer FM, *et al.* (2011) Malate-Mediated Carbon Catabolite Repression in *Bacillus subtilis* Involves the HPrK/CcpA Pathway. *J Bacteriol* 193(24):6939-6949.
- Nicolas P, *et al.* (2012) Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335(6072):1103-1106.
- Buescher JM, *et al.* (2012) Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. *Science* 335(6072):1099-1103.
- Li S, Huang D, Li Y, Wen J, & Jia X (2012) Rational improvement of the engineered isobutanol-producing *Bacillus subtilis* by elementary mode analysis. *Microbial Cell Factories* 11(1):101.
- Leyn SA, *et al.* (2013) Genomic reconstruction of the transcriptional regulatory network in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 195(11):2463-2473.
- Doan T, *et al.* (2003) The *Bacillus subtilis* *ywkA* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology* 149(Pt 9):2331-2343.
- Lerondel G, Doan T, Zamboni N, Sauer U, & Aymerich S (2006) YtsJ has the major physiological role of the four paralogous malic enzyme isoforms in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188(13):4727-4736.

We are very grateful to Dr. Gerd Seibold for providing the *C. glutamicum* ATCC13032 strain, the *mctC* mutant, and the *C. glutamicum*-*E. coli* shuttle expression vector pXMJ19. We would like to thank Dr. David Rudner for providing the *B. subtilis* integrative pDR111 plasmid. T.C. was supported by a doctoral grant from the French Ministry of Education and Research. LC-MS/MS analyses were performed on the Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO).

- Chen Y, Gozzi K, Yan F, & Chai Y (2015) Acetic Acid Acts as a Volatile Signal To Stimulate Bacterial Biofilm Formation. *MBio* 6(3):e00392.
- Sadykov MR & Bayles KW (2012) The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. *Curr Opin Microbiol* 15(2):211-215.
- Pick TR, *et al.* (2013) PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(8):3185-3190.
- Yang Y, *et al.* (2012) A chloroplast envelope membrane protein containing a putative LrgB domain related to the control of bacterial death and lysis is required for chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 193(1):81-95.
- Zhu T, *et al.* (2010) Impact of the *Staphylococcus epidermidis* LytSR two-component regulatory system on murein hydrolase activity, pyruvate utilization and global transcriptional profile. *BMC Microbiol* 10:287.
- Fried L, Behr S, & Jung K (2013) Identification of a target gene and activating stimulus for the YpdA/YpdB histidine kinase/response regulator system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 195(4):807-815.
- Behr S, Fried L, & Jung K (2014) Identification of a novel nutrient-sensing histidine kinase/response regulator network in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196(11):2023-2029.
- Wolfe AJ (2005) The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1):12-50.
- Wei K, Moinat M, Maarleveld TR, & Bruggeman FJ (2014) Stochastic simulation of prokaryotic two-component signalling indicates stochasticity-induced active-state locking and growth-rate dependent bistability. *Mol Biosyst* 10(9):2338-2346.
- Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, NY) Cold Spring Harbor Ed.
- Blencke HM, *et al.* (2003) Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab Eng* 5(2):133-149.
- Guerout-Fleury AM, Frandsen N, & Stragier P (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180(1-2):57-61.
- Servant P, Le Coq D, & Aymerich S (2005) CcpN (YqzB), a novel regulator for CcpA-independent catabolite repression of *Bacillus subtilis* gluconeogenic genes. *Mol Microbiol* 55(5):1435-1451.
- Delumeau O, *et al.* (2011) The dynamic protein partnership of RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *Proteomics* 11(15):2992-3001.

Please review all the figures in this paginated PDF and check if the figure size is appropriate to allow reading of the text in the figure.

If readability needs to be improved then resize the figure again in 'Figure sizing' interface of Article Sizing Tool.

Supporting Information for

The dual regulation of a novel pyruvate transporter ensures pyruvate homeostasis in *Bacillus subtilis*

Teddy Charbonnier¹, Dominique Le Coq^{1,2}, Olivier Delumeau¹, Magali Calabre¹, Stéphane Aymerich¹ and Matthieu Jules^{‡1}

¹ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France; ² Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

[‡] corresponding author

Running title: Pyruvate transport and homeostasis in *B. subtilis*

Table of content

1	Supporting Figures	3
2	Supporting Tables	9
3	Supporting Materials and Methods	15
3.1	YsbA and YsbB interaction	15
3.1.1	YsbA and YsbB: two membrane proteins	15
3.1.2	Tandem affinity purification using SPA-tagged YsbA and YsbB and controls.....	15
3.1.3	In-gel Digestion and nanoLC-MS/MS Analysis.....	16
3.1.4	Data Processing and Bioinformatics Analysis.....	16
3.2	Media, and strain and plasmid construction.....	17
3.2.1	Media.....	17
3.2.2	Strain and plasmid construction.....	17
3.3	Live Cell Array experiments and analyses.....	18
4	Supporting Results	19
4.1	Properties of the YsbAB (PftAB) pyruvate transport system	19
4.1.1	Toxicity of <i>ysbAB</i> in Gram negative bacteria.....	19
4.1.2	Kinetic properties of YsbAB	19
4.2	Transcriptional regulation of <i>ysbAB</i>	21
4.2.1	The two component system LytST	21
4.2.2	Modeling the induction of <i>ysbAB</i> expression by LytST	21
4.2.3	Modeling the putative intracellular pyruvate-mediated repression via LytST.....	22
5	Supporting References.....	24

1 Supporting Figures

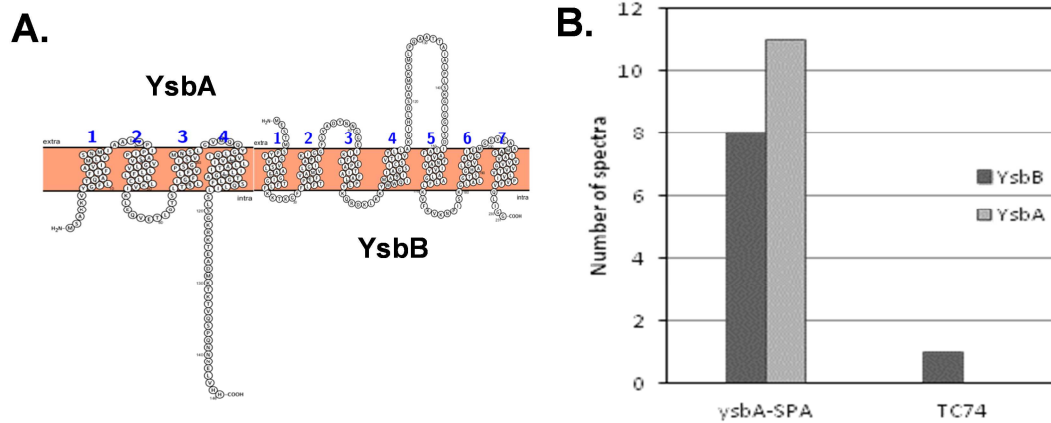


Figure S1. The YsbA/YsbB protein complex. **A.** The YsbA and YsbB transmembrane domain predictions were done with the Protter software (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>). Each blue number represent a putative transmembrane domain. **B.** Based on spectral counting the quantity of YsbB that is co-purified with YsbA-SPA after tandem affinity purification of the latest is shown. As a control, we applied a mocked tandem affinity purification with a membrane preparation from *B. subtilis* 168 wild-type strain (see **Supporting Information** §3.1). A representative experiment is presented.

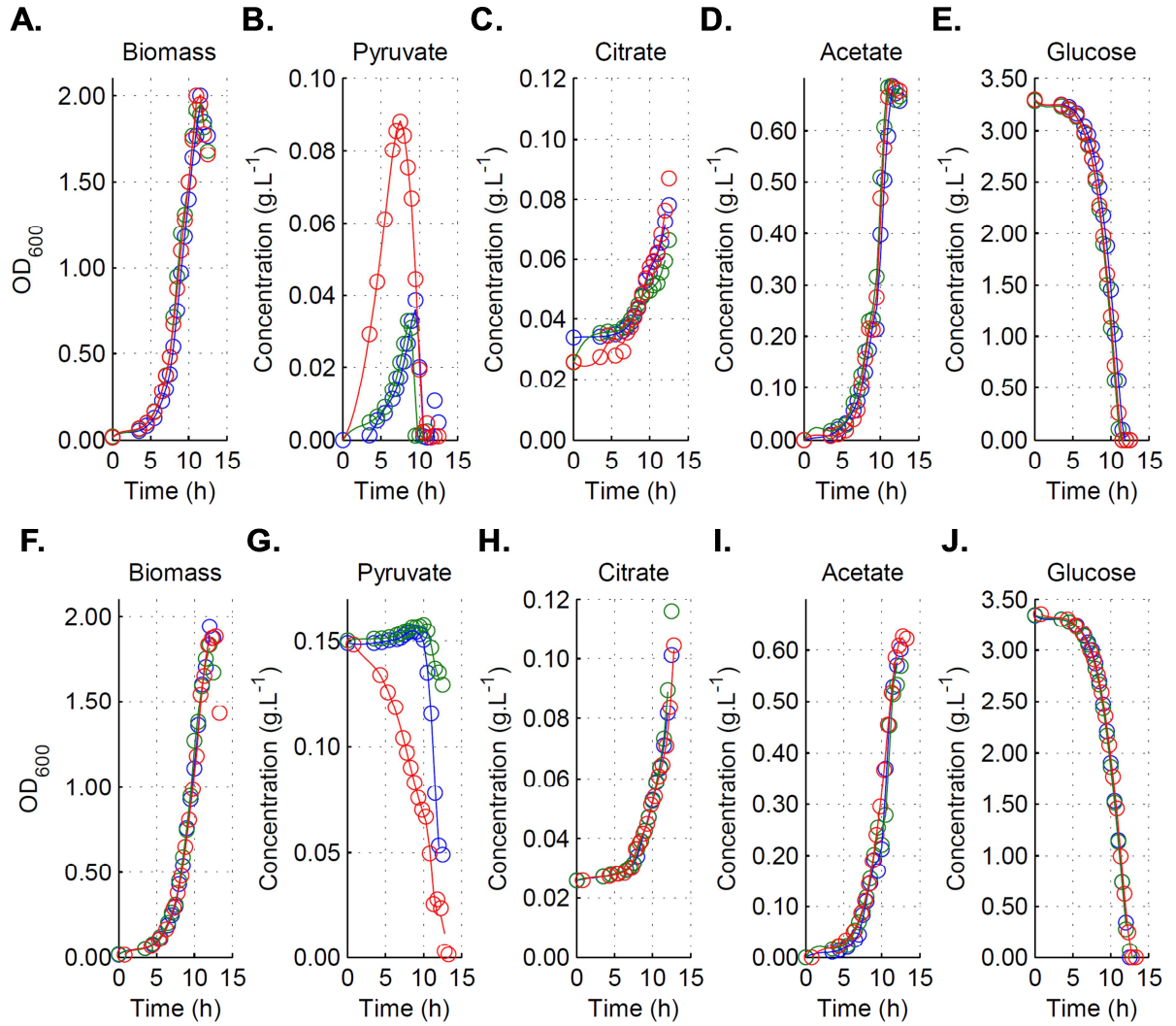


Figure S2. Growth of various strains and corresponding extracellular metabolite concentrations. The WT (bleu circles), $\Delta ysbAB$ (green circles), and $P_{hsysbAB}$ (red circles) strains were cultivated on M9G plus 200 μM IPTG (A to E) or M9G plus 0.15 g.L^{-1} pyruvate and 200 μM IPTG (F to J). The growth curves for M9G and M9G + 0.15 g.L^{-1} pyruvate are shown in panel A and F, respectively. The extracellular concentration of pyruvate (maximum specific production rate, $q_{Pyr}^{max} \sim 5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$), citrate ($q_{Cit}^{max} \sim 0.1 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$), acetate ($q_{Ace}^{max} \sim 5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$) and glucose (maximum specific consumption rate, $v_{Glc}^{max} \sim 8 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$) on M9G are shown on panel B, C, D and E, respectively. Extracellular concentration of pyruvate ($v_{Pyr}^{max} \sim 2 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$), citrate ($q_{Cit}^{max} \sim 0.1 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$), acetate ($q_{Ace}^{max} \sim 5 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$) and glucose ($v_{Glc}^{max} \sim 8 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{gDCW}^{-1}$) on M9G + 0.15 g.L^{-1} pyruvate are shown on panel B, C, D and E, respectively. A representative experiment is presented on each panel.

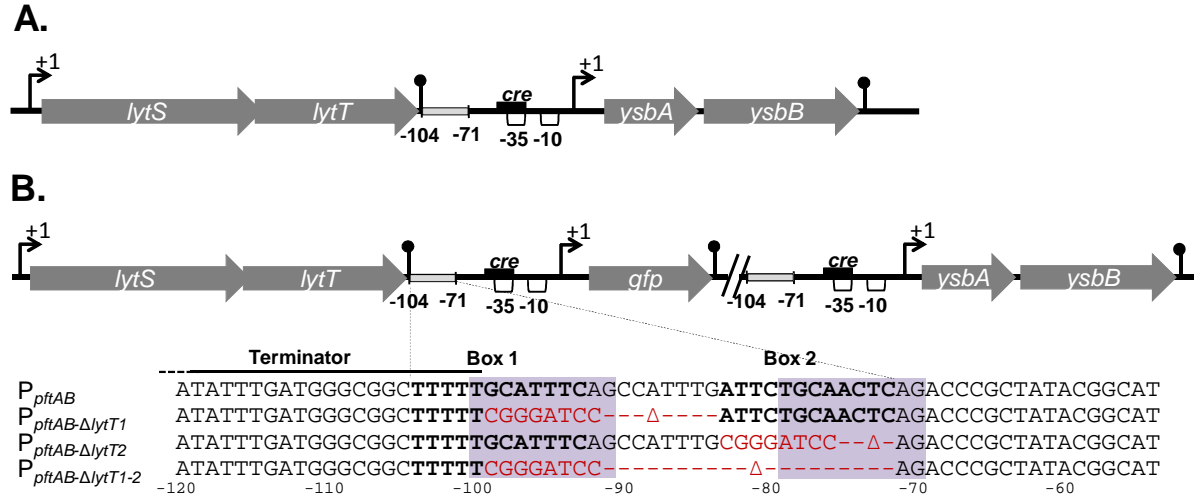


Figure S3. The LytST TCS binding site. **A.** Genomic organization of the *lytST ysbAB* region. The black box indicates the putative *cre* site for CcpA binding. The light grey box indicates the binding region of LytT. **B.** The binding region of LytT is detailed for the unmodified (P_{ysbAB}), Box1-deleted ($P_{pftAB-\Delta lytT1}$), Box2-deleted ($P_{pftAB-\Delta lytT2}$) and Box1-2 -deleted ($P_{pftAB-\Delta lytT1-2}$) reporter strains. Black bold letters stand for the two putative LytT DNA binding sequences (Box1, Box2) based on reference (13). The red letters indicate the DNA sequence that replaced the deleted region in each strain. The violet shaded regions are similar to the binding sites identified in *E. coli* for the LytT-like YpdA response regulator (21).

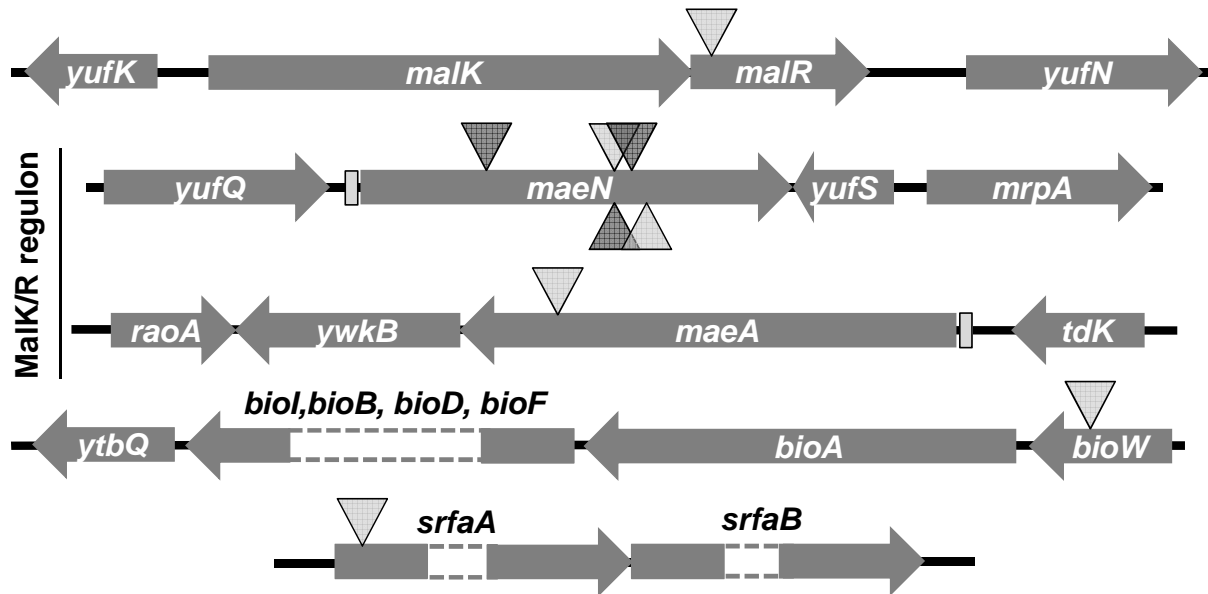


Figure S4. Transposon mutagenesis identified genes involved in the malate-induced CcpA-independent catabolite repression of *ysbAB*. Genes identified with random mutagenesis by transposition (~14000 clones screened). The insertions sites of the mini-Tn10 transposon in the *B. subtilis* genome are indicated as follows: the light gray triangles indicate an insertion in one clone and the dark gray triangles indicate one insertion in two independent clones. Genes *malk*, *malR*, *maeN* and *maeA* are involved in the malate assimilation pathway with the *malkR* operon that encodes a two component system, *maeN* encoding for the principal malate transporter and *maeA* encoding a malic enzyme. The expression of *maeN* and *maeA* are under the control the MalKR two component system, and the binding sites of MalR are indicated as light grey boxes upstream *maeA* and *maeN*. The gene *srfaA* is involved in surfactin production and the gene *bioW* is the first gene of an operon encoding enzymes of the pathway for biotin synthesis.

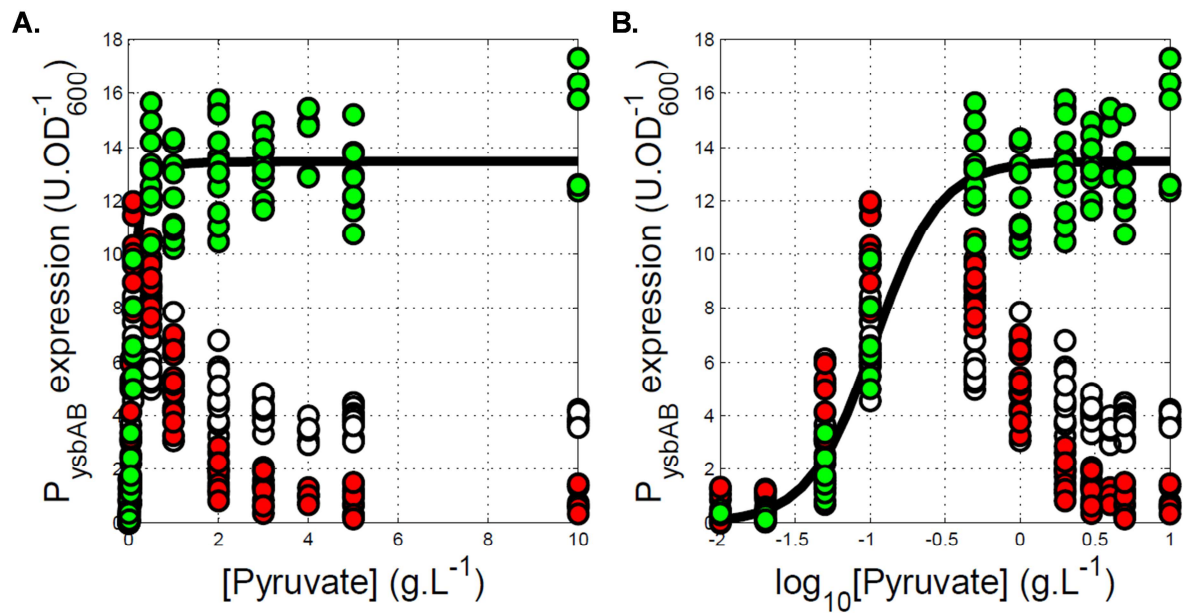


Figure S5. Intracellular pyruvate and pyruvate influx tightly control the expression of *ysbAB*. Expression of *ysbAB* in the WT (white circle), $\Delta ysbAB$ (red circle) and $P_{hs ysbAB}$ (green circle, 1 mM IPTG) strains grown in M9SE plus pyruvate (at concentrations ranging from ~0.1 to ~100 mM) in linear and log scale x-axis on panel **A** and **B**, respectively. Data points correspond to about 350 independent cultures and the mean values are plotted on **Figure 3**. Fitting the expression dataset of the $\Delta ysbAB$ mutant according to a Hill equation (black plain line) revealed a maximal activity of ~7000 s $^{-1}$ and a Hill coefficient of 2 (**Supporting Information §4.2**).

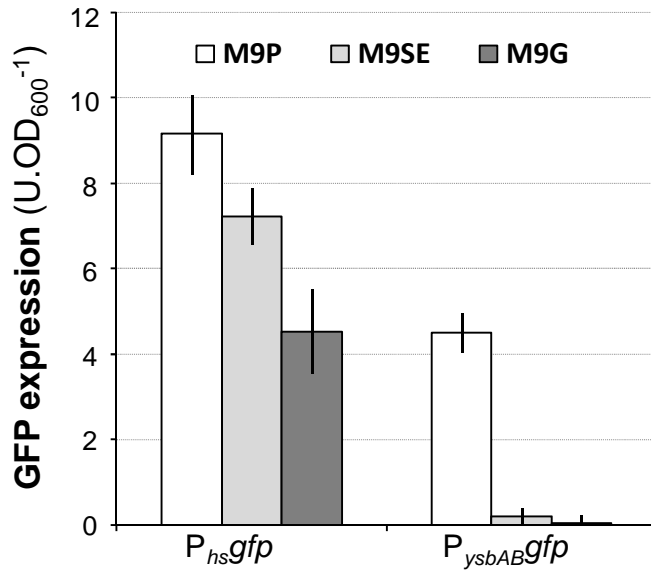


Figure S6. Expression levels of $P_{hs}gfp$ and $P_{ysbAB}gfp$ in various growth conditions. Expression levels were quantified in M9P, M9SE and M9G and were used to correct the estimation of the kinetic properties of YsbAB in relation with the measured level of expression of *ysbAB* (**Supporting Information §4.1** and **Table S2**). Mean values of at least six experiments with standard deviations are presented.

2 Supporting Tables

Table S1. *B. subtilis* (Bs) and *C. glutamicum* (Cg) strains used in this study

Strain	Relevant genotype	Source ^a
Bs, BSB168	Wild type (prototroph)	(10-11)
Bs, GM2924	$\Delta crh::aphA3$	(9)
Bs, GM2933	<i>ptsH1~cat</i>	(9)
Bs, GM1619	$\Delta malS::phleo$ ytsJ::pMUTIN2 (<i>erm</i>) <i>maeA::aphA3 trpC2</i>	Laboratory collection
Bs, GM2907	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo</i>	Laboratory collection
Bs, GM1626	<i>ywkB::pMUTIN (erm) trpC2</i>	Laboratory collection
Bs, TC01	<i>maeA':[pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::kan]</i>	GM1619 → BSB168
Bs, TC03	<i>ywkB::pMUTIN2 (erm)</i>	GM1626 → BSB168
Bs, TC28	<i>maeA':[pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::kan] P_{hs}malS/cm</i>	pDR111_ <i>malS</i> → TC01
Bs, TC29	<i>P_{hs}malS/cm</i>	pDR111_ <i>malS</i> → BSB168
Bs, TC35	<i>P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pBSB_ <i>P_{ysbAB}</i> → BSB168
Bs, TC36	<i>ccpA::Tn617Δ(term lacZ)::phleo P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pBSB_ <i>P_{ysbAB}</i> → GM2907
Bs, TC58	$\Delta lytST::cm$	pGEMT_ <i>lytST::cm</i> → BSB168
Bs, TC59	$\Delta lytST::cm$ <i>P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pBSB_ <i>P_{ysbAB}</i> → TC58
Bs, TC60	$\Delta ysbAB::cm$	pGEMT_ <i>ysbAB::cm</i> → BSB168
Bs, TC61	$\Delta ysbB::cm$	pGEMT_ <i>ysbB::cm</i> → BSB168
Bs, TC62	$\Delta ysbA::cm$ <i>P_{ysbAB}ysbB</i>	pGEMT_ <i>ysbA::cm</i> <i>P_{ysbAB}</i> → BSB168
Bs, TC63	<i>P_{ysbAB}-lacZ/cm</i>	pDG1661_ <i>P_{ysbAB}</i> → BSB168
Bs, TC64	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo P_{ysbAB}-lacZ/cm</i>	TC63 → GM2907
Bs, TC73	<i>lytST::cm P_{hs}lytST/erm</i>	pMUTIN4_ <i>lytST</i> → TC58
Bs, TC74	$\Delta ysbAB::cm$ <i>amyE::P_{hs}ysbAB/spec</i>	pDR111_ <i>ysbAB</i> → TC60
Bs, TC75	$\Delta ysbB::cm$ <i>amyE::P_{hs}ysbAB/spec</i>	pDR111_ <i>ysbAB</i> → TC61
Bs, TC76	$\Delta ysbA::cm$ <i>P_{ysbAB}ysbB amyE::P_{hs}ysbAB</i>	pDR111_ <i>ysbAB</i> → TC62
Bs, TC86	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo maeA':[pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::kan]</i>	TC01 → GM2907
Bs, TC87	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo ywkB::pMUTIN2 (erm)</i>	TC03 → GM2907
Bs, TC88	<i>maeA':[pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::kan] P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC01 → TC35
Bs, TC89	<i>ywkB::pMUTIN2 (erm) P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC03 → TC35
Bs, TC90	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo maeA':[pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::kan] P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC01 → TC36

Bs, TC91	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo ywkB::pMUTIN2 (erm) P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC03 → TC36
Bs, TC99	<i>Δcrh::aphA3 ptsH1~cat</i>	GM2925 → GM2933
Bs, TC100	<i>Δcrh::aphA3 P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	GM2925 → TC35
Bs, TC101	<i>ptsH1~cat P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC35 → GM2933
Bs, TC102	<i>Δcrh::aphA3 ptsH1~cat P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	GM2925 → TC101
Bs, TC103	<i>ccpA::Tn917Δ(erm lacZ)::phleo maeA'::[pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::kan] P_{hs}malS/cm</i>	TC29 → TC86
Bs, TC104	<i>maeA'::[pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::kan] P_{hs}malS/cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC29 → TC88
Bs, TC105	<i>ccpA::Tn617Δ(term lacZ)::phleo maeA'::[pMUTIN2 Δ(lacZ-ery)::kan] P_{hs}malS/cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC29 → TC90
Bs, TC112	<i>ΔysbAB::cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC35 → TC60
Bs, TC113	<i>ΔysbB::cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC35 → TC61
Bs, TC114	<i>ΔysbA::P_{ysbAB}-ysbB/cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC35 → TC62
Bs, TC122	<i>P_{ysbAB} ysbA-SPA/erm</i>	pYsbA_SPA → BSB168
Bs, TC124	<i>P_{ysbAB} ysbB-SPA/erm</i>	pYsbB_SPA → BSB168
Bs, TC125	<i>P_{ysbAB}-lytT2-gfpmut3/spec</i>	pBSB_P _{ysbAB} -lytT2 → BSB168
Bs, TC126	<i>P_{ysbAB}-lytT1,2-gfpmut3/spec</i>	pBSB_P _{ysbAB} -lytT1,2 → BSB168
Bs, TC132	<i>amyE::P_{hs}ysbAB/spec</i>	pDR111_ysbAB → BSB168
Bs, TC136	<i>amyE::P_{hs}ysbAB/spec P_{ysbAB}-gfpmut3/cm</i>	pBSBIX_P _{ysbAB} → TC132
Bs, TC149	<i>P_{ysbAB}-lytT1-gfpmut3/spec</i>	pBSB_P _{ysbAB} -lytT1 → BSB168
Bs, TC150	<i>ΔysbAB::cm P_{ysbAB}-lytT1/spec</i>	TC60 → TC149
Bs, TC151	<i>ΔysbAB::cm P_{ysbAB}-lytT1,2/spec</i>	TC60 → TC126
Bs, TC152	<i>ΔysbAB::cm P_{ysbAB}-lytT2/spec</i>	TC60 → TC125
Bs, TC153	<i>ΔysbAB::cm P_{hs}ysbAB/erm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pDG1664_P _{hs} ysbAB → TC112
Bs, TC154	<i>ΔysbAB::cm P_{hs}ysbAB/erm</i>	pDG1664_P _{hs} ysbAB → TC60
Bs, TC163	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo ysbAB::cm</i>	TC60 → GM2907
Bs, TC164	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo ysbAB::cm P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	TC60 → TC133
Bs, TC166	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo ysbAB::cm P_{ysbAB}-lytT1,2/spec</i>	TC60 → TC147
Bs, TC175	<i>P_{hs}P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	pDR111_P _{hs} P _{ysbAB} → BSB168
Bs, TC178	<i>ccpA::Tn917Δ(term lacZ)::phleo P_{hs}P_{ysbAB}-gfpmut3/spec</i>	GM2907 → TC175
Cg, ATCC130TC	Wild type	(3)
Cg, Cg0953	<i>ΔmctC</i>	(3)
Cg, TC200	Wild type	pXMJ19 → ATCC13032
Cg, TC201	<i>ΔmctC</i>	pXMJ19 → Cg0953
Cg, TC202	<i>P_{tac}-ysbAB/cm</i>	pXMJ_ysbAB → ATCC13032
Cg, TC203	<i>ΔmctC P_{tac}-ysbAB/cm</i>	pXMJ_ysbAB → Cg0953

^a Arrows indicate construction by transformation.

Table S2. Growth rates of wild-type, mutants and complemented strains in M9 plus various substrates

Strains	Growth rate (μ , h ⁻¹)			
	M9P	M9G	M9M	M9SE
BSB168	0.25 ± 0.08	0.74 ± 0.04	0.83 ± 0.05	0.52 ± 0.08
TC58	- ^b	0.67 ± 0.03	0.80 ± 0.04	0.52 ± 0.08
TC60	- ^b	0.70 ± 0.03	0.80 ± 0.05	0.49 ± 0.04
TC61	- ^b	0.71 ± 0.01	0.78 ± 0.04	0.52 ± 0.05
TC62	- ^b	0.72 ± 0.03	0.79 ± 0.04	0.53 ± 0.05
TC73 ^a	0.28 ± 0.07	0.67 ± 0.02	0.78 ± 0.03	0.56 ± 0.03
TC74 ^a	0.25 ± 0.05	0.66 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.47 ± 0.06
TC75 ^a	0.26 ± 0.04	0.62 ± 0.07	0.76 ± 0.05	0.45 ± 0.06
TC76 ^a	0.25 ± 0.05	0.65 ± 0.06	0.76 ± 0.04	0.47 ± 0.08

^a the growth medium was supplemented with IPTG 200 μ M for functional complementation.

^b cryptic growth (*i.e.* non exponential growth and low biomass final titer, see **Figure 1B**).

Table S3. Pyruvate concentrations, specific pyruvate uptake rate and YsbAB expression level in various growth conditions

Growth conditions (i)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Medium	MM+G	M9P	M9G+P	M9G	M9PM	M9M
$J_{net}^{(i)} = q_{pyr}$ (mmol.h ⁻¹ .gCDW ⁻¹)	-	8.26 ± 0.23 ^f	1.90 ± 0.06 ^c	-5.00 ± 0.15 ^c	0.90 ± 0.10 ^g	-
$[Pyr]_{ex}^{(i)}$ (mmol.L ⁻¹)	-	68.14 ± 0.07 ^f	1.70 ± 0.01 ^c	0 ^a	45.42 ± 0.07 ^g	-
$[Pyr]_{in}^{(i)}$ (mmol.L ⁻¹)	1.00 ± 0.20 ^e	<i>n.d.</i> ^b	<i>n.d.</i> ^b	<i>n.d.</i> ^b	<i>n.d.</i> ^b	10.00 ± 2.00 ^h
<i>ysbAB</i> under the control of	P _{<i>ysbAB</i>}	P _{<i>ysbAB</i>}	P _{<i>hs</i>}	P _{<i>hs</i>}	P _{<i>ysbAB</i>}	P _{<i>ysbAB</i>}
YsbAB expression level (U.OD ⁻¹)	0.00 ± 0.10 ^d	4.50 ± 0.45 ^d	4.50 ± 0.50 ^d	4.50 ± 0.50 ^d	0.50 ± 0.10 ^d	0.70 ± 0.15 ^d

^a At the beginning of the growth (initial condition)^b *n.d.* not determined^c this work, inferred from the data plotted on **Figure S2**^d this work (**Table 2** and **Figure S6**)^e from reference (12)^f from reference (5)^g from reference (8)^h from reference (11)

Table S4. Relationships between strains, plasmids and primers used in this work.

Strain	Plasmid	Primer	Sequence (5'→3') ^a	Template
TC35	pBSB_P _{ysbAB}	P _{ysbAB} _FW	<u>CCGCGGGCTTTCCCAGCCTCTTGATTATTTAACC</u> AA	BSB168
		P _{ysbAB} _RV	GTTCCTCCTTCCCACCCTCATTATAAATAAGAA	BSB168
TC58	pGEMT_ <i>lytST</i>	<i>LytT</i> _FW	GATAAAGGAAGCGCAATTGC	BSB168
		<i>LytT</i> _RV	CAATGGAACAGGCAGTTTTTA	BSB168
	pGEMT_ <i>lytST::cm</i>	<i>Cm_lytT</i> _FW	TCCCCCGGGGATTACCCGACAAACAACAGATAAAA	pDG1661
		<i>Cm_lytT</i> _RV	CCATCGATGGTATAAAAACCTTCTTCAACTAACGGG	pDG1661
TC63	pDG1661_P _{ysbB}	P _{ysbB} _FW	CGGGATCCCGTTTGGTACCCTCATTATAAATAAGAA	BSB168
		P _{ysbB} _RV	CCCAAGCTTGGGGCTTTGTTCGTGAATACTGAATATA	BSB168
TC60, TC61 & TC62	pGEMT_ <i>ysbAB</i>	insert_ <i>ysbAB</i> _FW	CCCCACCCAGAATACAAAGA	BSB168
		insert_ <i>ysbAB</i> _RV	GGATGAACTGGCTTACTTGC	BSB168
	pGEMT_ <i>ysbA</i>	pGEMT_ <i>ysbA</i> _F	TCCCCCGGGGAAATCATATTTGAAACCAGCATAAT	pGEMT_ <i>ysbAB</i>
		pGEMT_ <i>ysbA</i> _R	GCTCTAGAGCACAAAAACAGTGCAAAGCCCGCAGAA	pGEMT_ <i>ysbAB</i>
	pGEMT_ <i>ysbB</i>	pGEMT_ <i>ysbB</i> _F	TCCCCCGGGGGAACCATGGCAACAAACAAAGGAGTGA	pGEMT_ <i>ysbAB</i>
		pGEMT_ <i>ysbB</i> _R	GCTCTAGAGCTAAAGGATTGGCTCTTGGAACATCCG	pGEMT_ <i>ysbAB</i>
	pGEMT_ <i>ysbAB::cm</i>	<i>cm</i> _FW	TCCCCCGGGGATCTTTATTCTTCAACTAAAGCACCCATTAG	pDG1661
	pGEMT_ <i>ysbB::cm</i>	<i>cm</i> _RV	GCTCTAGAGCGTAGAGGATCTGGAGCTGTA	pDG1661
	pGEMT_ <i>ysbA::cm</i> _P _{ysbAB}	<i>cm</i> _P _{ysbAB} _FW	GCTCTAGAGCGGATCCCGTTTGGTACCCTCATTATA	pDG1661_P _{ysbA}
		<i>cm</i> _P _{ysbAB} _RV	TCCCCCGGGGGAATAAAAACCTTCTTCAACTAACGG	pDG1661_P _{ysbA}
TC73	pMUTIN4_ <i>lytST</i>	<i>lytST</i> _FW	CGGGATCCATATTTTTTCTCCGCCTGTAAGCAAGTT	BSB168
		<i>lytST</i> _RV	<u>CGAGCTCG</u> TTATAAAGCGCTTACAAGATAACATGCC	BSB168

TC74, TC75 & TC76	pDR111_ysbAB	<i>ysbAB_FW</i>	<u>TCACGCGTCGACAGGAGGACTACTATGAGTGCTAAAAAAGTGTAC</u>	BSB168
		<i>ysbB_RV</i>	<u>TCCTAGCTAGCTTATCCTCCGATCAGCTGCACGAACAC</u>	BSB168
TC153, TC154	pDR111_ysbAB	618 FW	<u>AAGGAAAAAAGCGGCCGCCAAACTTAAGAGTGTGTT</u>	pic618
		618 RV	<u>CTGGTGAAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACG</u>	pic618
	pDG1664_P _{hs} ysbAB	P _{hs} ysbAB FW	<u>AAATACGGGCAGACATGGCCTGCCCGGTTATTATTA</u>	pDR111_ysbA
		P _{hs} ysbAB RV	<u>AAGGAAAAAAGCGGCCGCGATTAATTAATTCAGAACGCTCGGTTG</u>	pDR111_ysbA
TC125, TC126 & TC149	pBSB_P _{ysbAB-lytT1} , pBSB_P _{ysbAB-lytT2} & pBSB_P _{ysbAB-lytT1.2}	<i>lytT1_FW</i>	<u>CGGGATCCATTCTGCAACTCAGACCCGCTATACG</u>	pBSB_P _{ysbAB}
		<i>lytT1,2_FW</i>	<u>CGGGATCCAGACCCGCTATACGGCATGTTATCT</u>	pBSB_P _{ysbAB}
		<i>lytT2_RV</i>	<u>GCGGATCCCGCAAATGGCTGAAATGCAA</u>	pBSB_P _{ysbAB}
		<i>lytT1,2_RV</i>	<u>GCGGATCCCGAAAAAGCCGCCCATCAAATATGG</u>	pBSB_P _{ysbAB}
TC122, TC124	pYsbA_SPA	<i>ysbA-LIC1</i>	<u>GGGTTCTCTGGCGCGAGCCGGGTTTTTAACACAAGC</u>	BSB168
		<i>ysbA-LIC2</i>	<u>TTGGGCTGGCGCGAGCATGGTGAACGAGTTCGTTATTG</u>	BSB168
	pYsbB_SPA	<i>ysbB-LIC1</i>	<u>GGGTTCTCTGGCGCGAGCGGCTCTATCTGCTCTGTCACG</u>	BSB168
		<i>ysbB-LIC2</i>	<u>TTGGGCTGGCGCGAGCTCCTCCGATCAGCTGCACG</u>	BSB168

^a Restriction sites and additional LIC sequences are underlined

3 Supporting Materials and Methods

3.1 YsbA and YsbB interaction

3.1.1 YsbA and YsbB: two membrane proteins

Consistent with our findings (see the main text and the text below), both YsbA and YsbB were predicted to be membrane proteins by TMHMM-program (30). To visualize the predicted structures of YsbA and YsbB we used Protter (31), whose predictions are in good agreement with those of Van Dijk *et al* (2012) although Protter and TMHMM differ in number of predicted transmembrane domains for YsbB, *i.e.* respectively 7 and 5 (**Figure S1A**).

3.1.2 Tandem affinity purification using SPA-tagged YsbA and YsbB and controls

As the tandem affinity purification (TAP-tag) technique has been developed to study protein-protein interactions, we used the YsbA-SPA and YsbB-SPA expressing strains to perform similar experiment. In the chromosome of *B. subtilis* *ysbA* and *ysbB* are adjacent, and the translational fusion of *ysbA* and the SPA sequence was obtained by the integration of the whole plasmid (pMUTIN-SPALIC derivatives) by single cross-over. In this construct, the P_{spac} promoter was inserted right upstream of *ysbB* to ensure that the gene is expressed. This prompted the question whether YsbB would be expressed at a high level and become a contaminant after YsbA-SPA purification by tandem affinity. As a control, we used a strain that expressed *ysbB* under the control of the P_{spac} promoter. Therefore TC74 strain - in which *ysbA* and *ysbB* are under the control of the P_{spac} promoter - was used and the minimal IPTG concentration for inducing YsbA and YsbB at a level able to sustain growth on pyruvate was determined. This was obtained with 50 μ M IPTG. Therefore cells of both strains were grown in M9P and 50 μ M IPTG. The procedure for tandem affinity purification of YsbA-SPA strain and for the TC74 strain were conducted in parallel and the purified proteins were identified by mass spectrometry. Although the analysis of the purified samples by mass spectrometry revealed various contaminants we focused our analysis on the presence of YsbB. With SPA-tagged YsbA purified by tandem affinity the presence of YsbB in the purified sample was detected (**Figure S1B**). By contrast, in the mocked purification realized with the strain expressing *ysbA* and *ysbB* with 50 μ M IPTG, traces of YsbB could be detected but no YsbA. Assuming that the number of MS spectra reflects crudely the quantity of protein present in a sample (29), the quantity of YsbB was 8-fold higher in the YsbA-SPA purification than in the mock purification (**Figure S1B**).

3.1.3 In-gel Digestion and nanoLC-MS/MS Analysis

Each lane of gel was cut and washed for 15 min with an acetonitrile / 100 mM ammonium bicarbonate mixture (1:1). Digestion was performed in 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 and the quantity of modified trypsin (Promega, sequencing grade) was 0.1 µg per sample. Digestion was achieved for 6 h at 37°C. A second digestion with chymotrypsin (Roche, sequencing grade) was achieved: 0.1 µg per sample. The supernatant was conserved. Peptides were extracted by 5% formic acid in water/acetonitrile (v/v). Supernatant and extract tryptic peptides were dried and resuspended in 20 µl of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid.

HPLC was performed on an Dionex RSLCnano (Thermo Fisher Scientific). A 4 µL sample was loaded at 20 µL/min-1 on a precolumn cartridge (stationary phase: C18 PepMap 100, 5 µm; column: 300 µm i.d., 5 mm; Dionex) and desalted with 0.08% TFA and 2% acetonitrile. After 4 min, the precolumn cartridge was connected to the separating PepMap C18 column (stationary phase: C18 PepMap 100, 3 µm; column: 75 µm i.d., 150 mm; Dionex). Buffers were 0.1% formic acid, 2% acetonitrile (A) and 0.1% formic acid and 80% acetonitrile (B). The peptide separation was achieved with a linear gradient from 0 to 36% B for 30 min at 300 nL/min-1. Including the regeneration step at 100% B and the equilibration step at 100% A, one run took 42 min. Eluted peptides were analysed on-line with a LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Electron) using a nanoelectrospray interface. Ionization (1.3 kV ionization potential) was performed with liquid junction and a capillary probe (10 µm i.d.; New Objective). Peptide ions were analysed using Xcalibur 2.07 with the following data-dependent acquisition steps (1): full MS scan in orbitrap (mass-to-charge ratio (m/z) 300 to 1600, profil mode) and (2) MS/MS in linear trap (qz = 0.25, activation time = 30 ms, and collision energy = 45%; centroid mode). Step 2 was repeated for the eight major ions detected in step 1. Dynamic exclusion time was set to 30 s.

3.1.4 Data Processing and Bioinformatics Analysis

The *Bacillus subtilis* 168 database was downloaded from UniprotKB Database site (March 2015, 4242 protein entries). In addition, the sequence of YsbA with SPA-Tag was incorporated in this database and in conjunction with reverse and contaminant databases, were searched by X!Tandem (version 2013.09.01.1, <http://www.thegpm.org/tandem/>) using X!Tandempipeline (version 3.3.4) developed by PAPPSO (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/>). Enzymatic cleavage was declared as a trypsin and a chymotrypsin digestion with one possible misscleavage. Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set to static and possible modifications, respectively. Precursor mass was 10 ppm and fragment mass tolerance was 0.02 Da. Only peptides with a E value smaller than 0.1 were reported. TandemPipeline (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>) according to: (1) A minimum

of two different peptides was required with an E value smaller than 0.05, (2) a protein log (E value) (calculated as the product of unique peptide E values) smaller than 2.10^{-3} . These criteria led to a False Discovery Rate (FDR) of 0.05 % for peptide and protein identification. To take redundancy into account, proteins with at least one peptide in common were grouped. This allowed to group proteins of similar function. Within each group, proteins with at least one specific peptide relatively to other members of the group were reported as sub-groups.

3.2 Media, and strain and plasmid construction

3.2.1 Media

Luria Bertani (LB) broth was used to grow *E. coli*, *B. subtilis* and *C. glutamicum* for transformation procedures only. *B. subtilis* was transformed with plasmids and chromosomal DNA according to the two-step protocol (32) and transformants were verified by sequencing. When required, media were supplemented with antibiotics at the following concentrations for *E. coli*: ampicillin $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, spectinomycin $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$; for *B. subtilis*: spectinomycin $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycin $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, erythromycin $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, phleomycin $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, chloramphenicol $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; and for *C. glutamicum*: chloramphenicol $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. *B. subtilis* was grown in a modified M9 minimal medium (33).

3.2.2 Strain and plasmid construction

Fusion of P_{ysbAB} with the *gfpmut3* gene was performed by ligation-independent cloning (LIC) using the pBSBII plasmid as described previously (34). Briefly for LIC, 0.2 pmol of each fragment was incubated with 2.5 mM dTTP and T4 DNA polymerase. The pBSBII plasmid was linearized using SmaI, gel-purified, and treated with T4 DNA polymerase and 2.5 mM dATP. A mix of 5 ng prepared vector and 15 ng inserts was used to transform *E. coli*. The resulting plasmids were extracted from *E. coli* and used to transform *B. subtilis*. Three independent clones from each transformation were selected and used for Live Cell Array (LCA, see §3.2.3) experiments.

Fusion of the SPA sequence at the 3' end of either *ysbA* or *ysbB* was performed using the pMUTIN-LICSPA plasmid, previously adapted from the pMUTIN-SPA for LIC to facilitate high throughput (HTP) cloning. Briefly, the LIC site was introduced by mutagenesis of the Acc65I and NcoI sites immediately upstream of the sequential peptide affinity (SPA) sequence by whole plasmid amplification thereby generating a unique Ascl recognition site enabling linearization of the plasmid for HTP cloning as previously described (35). The LIC was then performed as described above.

The mini-Tn10 delivery vector pIC333 used for transposon mutagenesis was previously constructed and validated (36). This plasmid was introduced into TC64 (Table 1)

at 25°C using erythromycin selection. Single transformant colonies were used to inoculate 6 independent cultures at 25°C in 2 mL LB plus spectinomycin. In early exponential growth, the temperature was shifted to 40°C and cultures were continued for 4 more hours. Appropriate dilutions of the cultures were spread on solid M9P+M plus spectinomycin and 0.04% X-Gal (5_bromo-4-chloro_indolyl-b-D-galactopyranoside), and incubated at 25°C to screen for clones with derepressed $P_{ysbAB}/lacZ$ expression (blue colonies).

3.3 Live Cell Array experiments and analyses

Cells were grown in 100 μ L of medium in a 96-well cell culture plate (CELLSTAR®, Greiner bio-one). All plates (with lids to avoid evaporation) were incubated at 37°C with constant shaking (slow) in a Synergy 2 multimode microplate reader (BioTek). OD₆₀₀ and fluorescence (ex. 485/20 nm, em. 528/20 nm) were measured every 10 minutes. Absorbencies at 900 nm and 977 nm (Abs_{900} , Abs_{977}) were read once at the beginning of each experiment in order to correct the OD₆₀₀ to an optical path length of 1 cm using the following equation: $(Abs_{977} - Abs_{900})/0.18$. Fluorescein was present on the microtiterplate at 2 different concentrations (1 and 10 nM) in duplicates. Each culture was performed in triplicates. Polynomial and exponential functions were used to fit the experimental datasets of GFP and biomass, respectively (11), and to deduce the rates of biomass and GFP productions along the growth. GFP concentration was estimated as GFP per OD₆₀₀, $(\frac{GFP}{OD})$, at each time point. In steady-state growth (μ =constant), $\frac{GFP}{OD}$ is constant. GFP concentration was expressed as unit per OD₆₀₀; 1 unit being equivalent to 1 pM of fluorescein.

4 Supporting Results

4.1 Properties of the YsbAB (PftAB) pyruvate transport system

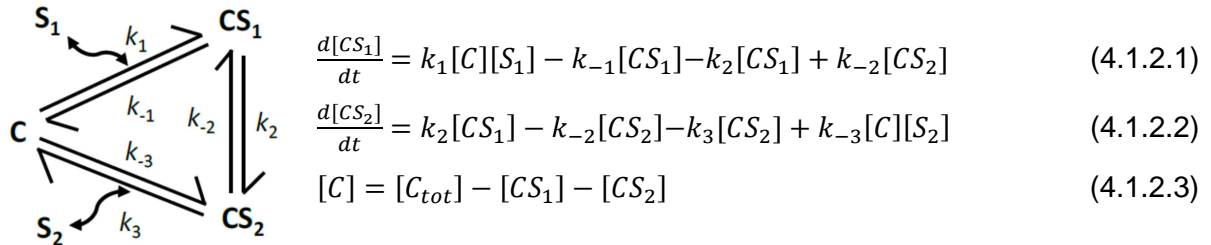
4.1.1 Toxicity of *ysbAB* in Gram negative bacteria

Although no pyruvate transporter has been identified in *Escherichia coli*, we tested for functional complementation of a K-12 derived *E. coli* strain deficient for the utilization of pyruvate as a sole carbon source (37). Unfortunately, the heterologous expression of *ysbAB* appeared to be highly toxic in an IPTG concentration-dependent manner for the *E. coli* host cells grown in LB medium (data not shown). Consistent results were obtained when *ysbAB* was expressed (inducible or constitutive) in other *E. coli* genetic background (*i.e.* DH5 α , Top10). The YsbAB related toxicity in *E. coli* may indicate that the expression of *B. subtilis ysbAB* in Gram negative bacteria is not suitable. As indicated in the main text, this prompted us to use *C. glutamicum* as a new host for functional complementation.

4.1.2 Kinetic properties of YsbAB

4.1.2.1 General mathematical framework for a simple pore (Facilitated transport)

For a simple pore (Figure below from Pradhan *et al.* (38)), the set of equations describing the rates of change of bound and unbound states of the protein are:



where the solute *S* in aqueous phase 1 (*S*₁; *eg* extracellular) is translocated to aqueous phase 2 (*S*₂; *eg* intracellular) by first associating with the free carrier (*C*) forming a solute carrier complex *CS*₁. *CS*₁ undergoes a conformational change to *CS*₂, which dissociates and releases solute *S* to aqueous phase 2 (*S*₂). The rate constants for each elementary step *i* are denoted by *k_i* for the forward direction and *k_{-i}* for the reverse direction.

Under steady-state operation of the catalytic cycle described above and in Eqs. (4.1.2.1 - 3), it is straightforward to show that the net solute flux through the pore is given by:

$$J_{net} = k_2[CS_1] - k_{-2}[CS_2] = [C_{tot}] \frac{(k_1 k_2 k_3 [S_1] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} [S_2])}{D} \quad (4.1.2.4)$$

with the denominator,

$$D = k_{-1}(k_{-2} + k_3) + k_2 k_3 + k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)[S_1] + k_{-3}(k_{-2} + k_{-1} + k_2)[S_2]$$

At equilibrium, the net solute flux through the carrier is zero, which results in the following thermodynamic constraint for the rate constants governing the simple pore model:

$$\frac{[S_1]^{eq}}{[S_2]^{eq}} = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1} k_{-2} k_{-3}} \quad (4.1.2.5)$$

Under rapid equilibrium assumption, it is straightforward to show that the net solute flux through the pore are given by:

$$J_{net} = k_2[CS_1] - k_{-2}[CS_2] = [C_{tot}] \frac{(k_2[S_1] - k_{-2}[S_2])}{D} \quad (4.1.2.6)$$

with the denominator, $D = K_s + [S_1] + [S_2]$, K_s being the dissociation equilibrium constants. The equilibrium relationship and the thermodynamic constraint for the rate constants governing the simple pore model (Eq. 4.1.2.6) is then reduced to:

$$\frac{[S_1]^{eq}}{[S_2]^{eq}} = \frac{k_2}{k_{-2}} \quad (4.1.2.7)$$

4.1.2.2 Estimation of the V_M (J_{max}) and K_M of YsbAB

For *B. subtilis* grown on M9G (growth condition **(4)** from **Table S3**), $\frac{k_2}{k_{-2}} \sim 1$ ($[Pyr]_{in}^{eq}$ is of about 1 mmol.L⁻¹ on M9G (12) when $[Pyr]_{ex}^{eq}$ reached a maximum at about 1 mmol.L⁻¹, **Figure 2** and **Figure S2**). Under the assumption that $\frac{[Pyr]_{in}^{eq}}{[Pyr]_{ex}^{eq}} = \frac{k_2}{k_{-2}} \sim 1$, it is straightforward to show that the net pyruvate flux in a given growth condition ($J_{net}^{(i)}$) is:

$$J_{net}^{(i)} = \frac{J_{max}([Pyr]_{ex}^{(i)} - [Pyr]_{in}^{(i)})}{K_M + [Pyr]_{ex}^{(i)} + [Pyr]_{in}^{(i)}} \quad (4.1.2.8)$$

where $[Pyr]_{ex}^{(i)}$ and $[Pyr]_{in}^{(i)}$ are the extracellular and intracellular concentrations of pyruvate in the growth condition (i); $J_{max} = k_2[YsbAB]_{Tot}$ is the maximal transport rate; and K_M is the Michaelis–Menten constant for transport. We can rewrite equation (4.1.2.8) as follows:

$$K_M = \frac{J_{max}([Pyr]_{ex}^{(i)} - [Pyr]_{in}^{(i)}) - J_{net}^{(i)}([Pyr]_{ex}^{(i)} + [Pyr]_{in}^{(i)})}{J_{net}^{(i)}} \quad (4.1.2.9)$$

J_{max} depending on the level of YsbAB (PftAB), we have chosen to normalize the expression of *ysbAB* in the different growth conditions to the growth condition M9P (growth condition **(2)** from **Table S3**) using the *ysbAB* expression levels. Hence, J_{max} corresponds from now on to the maximal transport rate of cells grown in presence of pyruvate as sole carbon source (*i.e.* for a level of expression of YsbAB of about 4.5 U.OD₆₀₀⁻¹).

Making use of the physiological parameters (**Table S3** and **Figure S6**) and of the levels of expression of YsbAB in the different growth conditions (**Table S3**), we next solved equation (4.1.2.9) and inferred the J_{max} and K_M using the following constraints:

- $J_{max} > J_{net}^{(2)} > 0$
- $[Pyr]_{in}^{(2)} < [Pyr]_{out}^{(2)}$
- $[Pyr]_{in}^{(5)} \sim [Pyr]_{in}^{(6)} > [Pyr]_{in}^{(2)} > [Pyr]_{in}^{(4)} \sim [Pyr]_{in}^{(1)} > 0$

The resolution of the abovementioned constrained equations led to $J_{max} = 10.0 \pm 1.0$ mmol.h⁻¹.gCDW⁻¹ (relative to the level of YsbAB in M9P) and $K_M = 1.0 \pm 0.1$ mmol.L⁻¹.

4.2 Transcriptional regulation of *ysbAB*

4.2.1 The two component system LytST

LytS, the sensor histidine kinase, was named after its putative transmembrane domain belonging to the 5TMR-LYT family and LytT, the response regulator, was named after its DNA-binding domain belonging to the DNA-binding response regulator LytTR superfamily (6). Immediately upstream from *pftAB*, we found the LytST two component system encoding operon to be responsible for the induction of *pftAB* in presence of extracellular pyruvate. A similar chromosomal organization is found in many firmicutes and other evolutionary-distant bacterial genomes (39).

4.2.2 Modeling the induction of *ysbAB* expression by LytST

As recently showed by Wei *et al* (24), the active response regulator concentration ([RP]) of a classical TCS increases linearly in proportion to the signal strength (*i.e.* the amount of inducer/ligand, [L]) so that we can write:

$$[RP] = \alpha[L] \quad (4.2.2.1)$$

Note that this relationship remains true only until the response regulator is fully activated. Afterwards [RP] remains constant (*i.e.* 100% of total response regulator).

In the Δ *ysbAB* strain, we can reasonably assume that the uptake of pyruvate by cells grown in M9SE+P is close to zero and therefore that the intracellular pyruvate concentration is comparable to that in M9SE. Hence, the LytST TCS-mediated induction of P_{ysbAB} must not be affected by the level of intracellular pyruvate and behave as for the classical TCS so that: $[LytT_{act}] = \alpha[L]$ with $LytT_{act}$ and L corresponding to the active LytT and extracellular pyruvate, respectively.

Wei *et al* (24) also developed a deterministic model of TCS induction in which the proportion of time for which DNA is activated is represented by the Hill function:

$$p^{(active)} = \frac{[RP]^n}{Kd^n + [RP]^n} \quad (4.2.2.2)$$

where Kd is the microscopic dissociation constant of RP to its regulatory site, n is the multimerisation of RP required to bind to DNA (most generally n=2).

Considering for LytT a simple model of TCS-mediated promoter induction by a dimeric response regulator (4.2.2.1 into 4.2.2.2 with n=2) leads to:

$$P_{ysbAB}^{(active)} = \frac{[LytT_{act}]^2}{Kd^2 + [LytT_{act}]^2} = \frac{(\alpha[L])^2}{Kd^2 + (\alpha[L])^2} \quad (4.2.2.3)$$

In steady-state growth, we can derive the level of GFP abundance:

$$\frac{\partial GFP}{\partial t} = k_0 + k_1 P_{ysbAB}^{(active)} - \mu [GFP] - k_{deg}[GFP] = 0 \quad (4.2.2.4)$$

with k_0 and k_1 the basal production rates, μ the growth rate and k_{deg} the GFP degradation rate. Note that $k_0 = 0$ since the promoter of *ysbAB* is off in the absence of

induction and k_{deg} is negligible (for the very stable GFPmut3 variant used in this work, (34)) as compared to μ . Eq. 4.2.2.4 therefore simplifies into:

$$[GFP] = \frac{k_1}{\mu} P_{ysbAB}^{(active)} = \frac{k_1}{\mu} \left(\frac{[LytT_{act}]^2}{Kd^2 + [LytT_{act}]^2} \right) = \frac{k_1}{\mu} \left(\frac{(\alpha[L])^2}{Kd^2 + (\alpha[L])^2} \right) \quad (4.2.2.5)$$

which can be further written as:

$$[GFP] = \frac{k_s}{\mu} \left(\frac{[L]^2}{Kd_a + [L]^2} \right) \quad (4.2.2.6)$$

$$\text{where } Kd_a = \left(\frac{Kd^2}{\alpha^2} \right) \text{ and } k_s = k_1$$

Plotting the data of the $\Delta ysbAB$ strain according to the Hill equation with a coefficient of 2 revealed a maximal activity ($\frac{k_s}{\mu}$) of $\sim 7000 \text{ s}^{-1}$ and an apparent dissociation constant (Kd_a) of ~ 1.5 (**Figure S5**). However, note that by construction the above-mentioned Hill equation reaches a plateau when $[L]$ is saturating and cannot therefore fit the data (from **Figure S5**) for the wild-type and $P_{hs} ysbAB$ strains.

4.2.3 Modeling the putative intracellular pyruvate-mediated repression via LytST

In order to get insight into the mechanism of intracellular pyruvate-mediated "repression" via LytST, we modeled three types of putative inhibitions of LytT activation (*i.e.* phosphorylation) by intracellular pyruvate (I): competitive inhibition, uncompetitive inhibition and non competitive inhibition. We solved the related differential equations at steady state and obtained for:

- competitive inhibition: $[LytT_{act}] = \frac{LytT_{total} [L]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [L]} \quad (4.2.3.1)$

- uncompetitive inhibition: $[LytT_{act}] = \frac{LytT_{total} [L]}{K_M + \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) [L]} \quad (4.2.3.2)$

- non competitive inhibition: $[LytT_{act}] = \frac{LytT_{total} [L]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) (K_M + [L])} \quad (4.2.3.3)$

$LytT_{total}$ corresponds to the total amount of LytT (active+inactive); L and I correspond to extracellular and intracellular pyruvate, respectively; K_M corresponds somehow to the affinity constant for LytS (under the assumption that $[LytS_{act}]$ is linearly correlated with $[L]$); and K_i corresponds to the inhibition constant.

We were unable to identify biologically relevant parameters that can fit the data from **Figure S5** for the wild-type and $P_{hs} ysbAB$ strains using these three equations. Indeed, introducing Eqs. 4.2.3.1 to 3 into equation 4.2.2.2 (with $n=2$) directly reveals that in order to observe a repression (*i.e.* reduction of GFP abundance when the level of extracellular pyruvate increases) the equations 4.2.3.1 to 3 must be minimized. By construction minimizing Eq. 4.2.3.1 implies that $[I]$ decreases when $[L]$ increases. The conclusion is similar for Eqs. 4.2.3.2 and 3. These conclusions are not consistent with the assumption that intracellular pyruvate hinders LytST induction (since we expect that an increase of

extracellular pyruvate will lead to an increase of intracellular pyruvate). We therefore concluded that none of these inhibitions of LytT activation can explain the reduction of the LytST-mediated induction of *ysbAB*.

Different other molecular mechanisms may however explain the feed-back regulation of LytST by intracellular pyruvate (and/or an intermediate of overflow metabolism), such as an inhibition of LytS autophosphorylation or a hindered recruitment of the RNA polymerase.

5 Supporting References

30. van Dijk JM, et al. (2012) Ins and Outs of the *Bacillus subtilis* Membrane Proteome. *Bacillus : Cellular and Molecular Biology*, ed Graumann P (Caister Academic Press, Wymondham), pp 253-283.
31. Omasits U, Ahrens CH, Muller S, & Wollscheid B (2014) Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30(6):884-886.
32. Anagnostopoulos C & Spizizen J (1961) Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 81(5):741-746.
33. Harwood CR & Cutting SM (1990) Chemically defined growth media and supplements. *Molecular Biological Methods for Bacillus*, eds Harwood CR & Cutting SM (Wiley, Chichester, UK), p 548.
34. Botella E, et al. (2010) pBaSysBioII: an integrative plasmid generating *gfp* transcriptional fusions for high-throughput analysis of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 156(Pt 6):1600-1608.
35. Doherty GP, Fogg MJ, Wilkinson AJ, & Lewis PJ (2010) Small subunits of RNA polymerase: localization, levels and implications for core enzyme composition. *Microbiology* 156(Pt 12):3532-3543.
36. Steinmetz M & Richter R (1994) Easy cloning of mini-Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome. *J Bacteriol* 176(6):1761-1763.
37. Kreth J, Lengeler JW, & Jahreis K (2013) Characterization of pyruvate uptake in *Escherichia coli* K-12. *PLoS One* 8(6):e67125.
38. Pradhan RK, Vinnakota KC, Beard DA, & Dash RK (2013) Chapter 5 - Carrier-Mediated Transport Through Biomembranes. *Transport in Biological Media*, eds Becker SM & Kuznetsov AV (Elsevier, Boston), pp 181-212.
39. <http://pubseed.theseed.org/SubsysEditor.cgi?page=ShowSpreadsheet&subsystem=LrgAB>

Transport du pyruvate et régulations du métabolisme central par le malate chez *Bacillus subtilis*

Mots clés : *Bacillus subtilis*, pyruvate, transport, régulation, malate

Résumé : Chez *Bacillus subtilis* comme pour toutes les bactéries, le métabolisme central du carbone est essentiel pour la croissance de la cellule. Elle utilise le glucose (source de carbone glycolytique) et le malate (source de carbone gluconéogénique) comme sources de carbone préférentielles. Ces deux sources de carbone sont capables d'induire la répression catabolique au travers de la protéine régulatrice CcpA et ainsi d'établir une hiérarchie dans l'utilisation des sources alternatives de carbone. Au centre du métabolisme du carbone se trouve le pyruvate que *B. subtilis* est capable d'utiliser comme seule source de carbone, mais son transporteur reste inconnu.

Des analyses transcriptomiques ont montré que seul l'opéron *ysbAB* était spécifiquement induit en présence de pyruvate, et nous avons montré que sa délétion entraînait une perte de croissance presque totale sur pyruvate. En utilisant des protéines étiquetées, nous avons mis en évidence qu'YsbA et YsbB formaient un complexe se localisant à la membrane.

Nous avons ensuite montré que ce complexe est le transporteur principal du pyruvate et fonctionne comme un transporteur par diffusion facilitée. À l'aide d'une fusion rapportrice, nous avons démontré que l'opéron *lytST* situé en amont d'*ysbAB*, et codant pour un système à deux composants, était responsable de l'induction d'*ysbAB*. Nous avons également montré qu'en plus d'une répression par CcpA en présence de glucose ou de malate, une régulation dépendante de l'activité enzyme malique de MaeA s'exerce sur *ysbAB*. Cette régulation est due à l'accumulation de pyruvate dans la cellule qui perturbe l'activation d'*ysbAB* par *LytST*.

Nous avons aussi montré qu'une régulation indépendante de CcpA s'exerce sur *dctP*, le gène codant pour le transporteur du succinate et du fumarate en présence de malate, suggérant un mécanisme similaire à celui observé pour *ysbAB*. Enfin, nous avons montré que le flux métabolique traversant MaeA était également impliqué dans la régulation par CcpA de l'entrée des sources glycolytiques par le malate.

Pyruvate transport and central metabolism regulation by malate in *Bacillus subtilis*

Keywords : *Bacillus subtilis*, pyruvate, transport, regulation, malate

Abstract : In *Bacillus subtilis* like for all the bacteria, the central carbon metabolism is essential for growth. It uses glucose (a glycolytic carbon source) and malate (a gluconeogenic carbon source) as preferential carbon sources. These two carbon sources are able to induce carbon catabolite repression through the transcription factor CcpA and thus establishing a hierarchy in the use of alternative carbon sources. The pyruvate is in the middle of the carbon metabolism, and can be used by *B. subtilis* as sole carbon source; however its transporter remains unknown. *tranquilliora vitae discessit*.

Transcriptome analyses revealed that the only operon specifically expressed in cells grown on pyruvate is *ysbAB*, and we showed that its deletion led to a strong growth defect on pyruvate. Using tagged proteins, we highlighted that YsbA and YsbB formed a complex localized at the membrane. We next showed that this complex is the major pyruvate transporter, and operates as a facilitated transporter.

Using a reporter fusion, we showed that the operon *lytST* located upstream of *ysbAB*, and coding for a two-component system, is responsible for the induction of *ysbAB*. We also showed that besides the CcpA-mediated repression by both glucose and malate, an additional regulation mechanism through the malic enzyme activity of MaeA is acting on *ysbAB*. This regulation is due to the accumulation of pyruvate in the cell which hinders the *LytST*-mediated induction of *ysbAB*.

We also showed that a CcpA-independent repression is exerted on *dctP*, the gene coding for the succinate and fumarate transporter, in the presence of malate, suggesting a regulation mechanism similar to the one observed for *ysbAB*. Finally, we showed that the metabolic flux going through MaeA is also involved in the CcpA-dependent repression of the genes coding for glycolytic transporter in presence of malate.